

Aus der
Klinik und Poliklinik für Herzchirurgie
Direktor: Prof. Dr. med. habil. Gustav Steinhoff

Universität
Rostock



Traditio et Innovatio

**Der Einfluss von CD105 auf das Regenerationspotential humaner
multipotenter mesenchymaler Stromazellen in einem
Myokardinfarktmodell der Maus**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität Rostock

vorgelegt von
Frank, Johannes
Geb. am 18.09.1982 in Leipzig

Rostock, 2013

Tag der Einreichung: 25. Mai 2013

Tag der Verteidigung: 3. Juni 2014

Dekan: Prof. Dr. med. habil. Emil Christian Reisinger

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Gustav Steinhoff, Klinik für Herzchirurgie,
Universitätsklinikum Rostock
2. Gruachter: Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar, Institut für Experimentelle Chirurgie,
Universitätsklinikum Rostock
3. Gutachter: Prof. Dr. med. Christof Stamm, Deutsches Herzzentrum Berlin,
Charité Berlin

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Gäbel R, Furlani D, Sorg H, Polchow B, **Frank J**, Bieback K, Wang W, Klopsch C, Ong L, Li W, Ma N, Steinhoff G.

Cell Origin of Human Mesenchymal Stem Cells Determines a Different Healing Performance in Cardiac Regeneration

PLoS One, 2011;6(2):e15652

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	8
1.1. Der Myokardinfarkt	8
1.2. Kardiales <i>Remodeling</i>	10
1.3. Humane Multipotente Mesenchymale Stromazellen	13
1.4. MSC in der Therapie des Herzinfarkts	16
1.5. CD105 (Endoglin)	19
1.6. Voraussetzungen und Ziele	24
2. Material und Methoden	25
2.1. Tiere und Tierhaltung	25
2.2. Versuchsdurchführung	25
2.2.1. Experimentelles Design	25
2.2.2. Vorbereitung und Durchführung der Operation	25
2.2.2.1. Materialien	27
2.2.3. Infarktgrößenbestimmung	28
2.2.3.1. Materialien	29
2.2.4. Bestimmung der kapillären Dichte	30
2.2.4.1. Materialien	30
2.3. Gewinnung und Kultivierung humaner mesenchymaler Stammzellen	31
2.3.1. Gewinnung und Charakterisierung von hMSC	31
2.3.2. Kultivierung von hMSC	32
2.3.3. Magnetseparation (MACS®)	32
2.3.4. Materialien	34
2.4. Lipofektion mit <i>Antisense</i> -ODN	35
2.4.1. <i>Antisense</i> -Oligodesoxynukleotide	35
2.4.2. Lipofektion	36
2.4.3. Materialien	36
2.5. Apoptosebestimmung <i>in vitro</i>	37
2.5.1. Hypoxiekammer	37
2.5.2. Tunelfärbung	37
2.6. Durchflusszytometrie zur Bestimmung der CD105-Expression	39
2.6.1. Funktionsweise eines Durchflusszytometers	39

2.6.2.	Bestimmung der CD105-Expression	40
2.7.	<i>Tube Forming</i> Assay	40
2.8.	Echtzeit-Azidifikation und Impedanz von hMSC <i>in vitro</i>	41
2.9.	Software	42
2.10.	Statistische Auswertung	42
2.11.	Material im Allgemeinen	42
3.	Ergebnisse	44
3.1.	Infarktgröße	44
3.2.	Kapilläre Dichte	45
3.3.	Echtzeitazidifikation und Zelladhäsion unter Hypoxie	46
3.4.	Apoptose <i>in vitro</i>	48
3.5.	Transfektionseffizienz	51
3.6.	<i>Tube forming</i> Assay	52
4.	Diskussion	54
4.1.	CD105 verringert die Infarktgröße und erhöht die Angiogene- nese	54
4.2.	Echtzeitazidifikation und Zelladhäsion	57
4.3.	Transfektionsrate	59
4.4.	CD105 reduziert die Apoptose unter Hypoxie	60
4.5.	MSC formen Netzwerke	61
5.	Zusammenfassung	63
	Literaturverzeichnis	64
	Anhang	75
	Abbildungsverzeichnis	75
	Tabellenverzeichnis	76
	Danksagung	78
	Thesen	79
	Selbstständigkeitserklärung	81

Abkürzungsverzeichnis

AMI	Akuter Myokardinfarkt
ALK-5	Activin receptor-like kinase
ASAT	Aspartat-Aminotransferase
Bcl-2	B-cell lymphoma; Gruppe antiapoptotischer Proteine
bFGF	Basic fibroblast growth factor
CK-MB	Creatinkinase-MB
EKG	Elektrokardiogramm
EZM	Extrazellulärmatrix
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony stimulating factor
HGF	Hepatocyte growth factor
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cell(s)
IGF-1	Insulin-like growth factor
IFN- γ	Interferon- γ
IL-6	Interleukin 6
LIF	Leukemia inhibitory factor
LVEF	Linksventrikuläre Ejektionsfraktion
MCP-1	Monocyte chemotactic protein 1
MMP-1	Matrix metallo proteinase-1
MNC	Mononuclear cell(s)
NSTEMI	Non ST elevation myocardial infarction
PAI-1	Plasminogen activator inhibitor-1
PCI	Percutaneous coronary intervention
SCF	Stem cell factor
SDF-1	Stromal cell-derived factor 1
STEMI	ST elevation myocardial infarction
T β R I +II	TGF- β -Receptor
TIMP	Tissue inhibitors of metalloproteinases
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
TGF- β	Transforming growth factor β
UCBC	Umbilical cord blood cells
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule
VEGF	Vascular endothelial growth factor

1. Einleitung

1.1. Der Myokardinfarkt

Der akute Myokardinfarkt (AMI) ist eine Gewebsnekrose des Herzmuskels, der in aller Regel durch eine hochgradige Stenose oder einen Verschluss einer Koronararterie hervorgerufen wird. Die zugrundeliegende Erkrankung ist zum überwiegenden Teil die koronare Herzkrankheit [1]. Sie ist sowohl in Europa (~21 %) als auch in Deutschland (10 %) die häufigste Todesursache [2].

In Deutschland war der AMI im Jahr 2007 die zweithäufigste Todesursache bei Männern (9 %) und dritthäufigste bei Frauen (7 %) (Statistisches Jahrbuch 2009). Die Inzidenz beträgt in Deutschland 330/100000 Einwohner. Die Lebenszeitprävalenz ist für Männer mit 30 % doppelt so hoch wie für Frauen (15 %).

Der zugrunde liegende Prozess, der zum Entstehen eines AMI führt, ist die Artherosklerose. Risikofaktoren, die die Ausbildung einer Artherosklerose begünstigen, sind unter anderem Rauchen, Hyperlipidämie, arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Übergewicht und Bewegungsmangel [1]. Die Endothelzellen werden durch einen oder mehrere dieser Risikofaktoren stimuliert und exprimieren Adhäsionsmoleküle und chemotaktische Moleküle. Die Folge ist die Rekrutierung von Monozyten und T-Lymphozyten. Die Hyperlipidämie führt außerdem zur Ablagerung von Lipiden in der Intima. Im weiteren Verlauf der Artherosklerose phagozytieren die zu Makrophagen differenzierten Monozyten diese Lipide und werden zu sogenannten Schaumzellen, gekennzeichnet durch einen hohen Anteil an intrazellulären Lipiden. Die lokalen Leukozyten können über die Ausschüttung von Entzündungsmediatoren weitere Leukozyten anlocken und die glatten Muskelzellen der Media zur Migration und Proliferation anregen. Der Plaque wird lumenwärts durch eine fibröse Kappe bedeckt. Kollagen, produziert durch die glatten Muskelzellen, stabilisiert die Kappe. Entscheidend für die Entwicklung eines Verschlusses einer Koronararterie ist nicht die Größe des Plaques sondern dessen Vulnerabilität, ergo seine Stabilität. Insbesondere lokale Entzündungsprozesse schwächen den Plaque und dessen fibröse Kappe [3], indem via Entzündungsmediatoren wie IFN- γ (Interferon- γ) die Produktion von Kollagen I und III durch glatte Muskelzellen gehemmt wird. Die Schaumzellen produzieren Matrixmetalloproteinasen, welche die extrazelluläre Matrix degradieren [4]. Die

geschwächte fibröse Kappe kann bei mechanischer Überbeanspruchung reißen. Zwei Arten werden unterschieden: Einerseits die tiefe Ruptur mit Freilegung des thrombogenen Lipidkerns und andererseits die oberflächliche Erosion [5, 6]. Die Folge ist die Entstehung eines Thrombus. Verschließt dieser das Gefäßlumen, kommt es zu einem AMI. Bei nur teilweisem Verschluss entsteht eine instabile Angina pectoris [7].

Das im Versorgungsgebiet der okkludierten Koronararterie betroffene Myokard ist der Gefahr einer Nekrose ausgesetzt. Was Reimer *et al.* 1977 als Wellenfrontphänomen des ischämischen Zelltodes in Hunden beschrieben, veranschaulicht, wie sich die Nekrosezone von subendokardial mit zunehmender Ischämiezeit nach subepicardial ausbreitet. Hierbei wird zwischen dem Myokard, welches durch irreversible Nekrose bedroht ist („*Myocardium at risk*“), und dem bereits nekrotischen nicht rettbaren Myokard unterschieden [8]. Beim Menschen ist der Progress des ischämischen Zelltodes deutlich langsamer als bei Tieren, wie Hund, Ratte oder Schwein [9]. Damit ist auch der Anteil an Myokard größer, der durch thrombolytische oder interventionelle Reperfusion gerettet werden kann. Jede Verzögerung von Symptombeginn bis zur Reperfusion durch perkutane Koronarintervention (PCI) bei Patienten mit ST-Hebungsinfarkt (STEMI) erhöht die 1-Jahres-Mortalität [10].

Klinisch präsentiert sich ein Infarkt durch ein Gefühl der Brustenge (Angina pectoris), retrosternalen Schmerzen mit möglicher Ausstrahlung in den linken Arm, Schulter, Hals, Unterkiefer oder Oberbauch. Vegetative Symptome können Angst, Kaltschweißigkeit, Übelkeit oder Erbrechen sein. In 95 % der Fälle treten Herzrhythmusstörungen auf. Laborchemisch demarkiert sich ein Infarkt durch einen Anstieg der Herzenzyme Troponin T und I, Creatinkinase-MB (CK-MB) und der nicht herzspezifischen Aspartat-Aminotransferase (ASAT). Im Elektrokardiogramm (EKG) treten in den Ableitungen über dem Infarkt typische Veränderungen auf. Bei einem transmuralen frischen Infarkt zeigt sich eine ST-Strecken-Überhöhung. Hierbei wird von einem ST-Hebungsinfarkt gesprochen (STEMI). Ein Enzymanstieg ohne ST-Hebung wird als Nicht-ST-Hebungsinfarkt klassifiziert (NSTEMI). Mit Hilfe des EKG lässt sich grob die Lokalisation bestimmen. Die Aussage, welches Koronargefäß betroffen ist, erlaubt allerdings nur die Koronargefäßangiographie.

Wie bereits erwähnt, ist die Zeit bis zur Reperfusion entscheidend für die Morbidität und Letalität. Laut den Leitlinien der Europäischen Gesellschaft für Kardiologie ist eine Zuführung des Patienten zu einem Krankenhaus mit PCI innerhalb der ersten drei Stunden nach Schmerzbeginn anzustreben. Sollte dies nicht möglich sein, kann eine Thrombolysetherapie versucht werden. Dieser sollte sich aber innerhalb von 24 h eine

PCI anschliessen [11].

Auch bei frühzeitiger Reperfusion gibt es Herzmuskelanteile, welche unweigerlich nekrotisch sind. Je nach Ausmaß führt diese zunächst lokale Schädigung zu Veränderungen am gesamten Herzen. Dieser Prozess wird als kardiales *Remodeling* bezeichnet.

1.2. Kardiales *Remodeling*

Remodeling ist definiert als Veränderungen der Struktur (Größe, Masse, Form) und Funktion des Herzens infolge hämodynamischer Belastung und/oder Schädigung des Herzens, einhergehend mit neurohormonaler Aktivierung. Es kann sich dabei um physiologisches *Remodeling*, etwa nach körperlichem Training, oder pathologisches *Remodeling* nach AMI, Klappenvitien oder Kardiomyopathien handeln [12].

Das *Remodeling* nach einem Herzinfarkt ist gekennzeichnet durch Narbenbildung, Wandausdünnung und Dilatation im Infarktgebiet mit der Folge eines erhöhten linksventrikulären Volumens, einer kombinierten Volumen- und Druckbelastung im nicht-infarzierten Gebiet sowie einer gemischt konzentrisch-exzentrischen Hypertrophie (Abb. 1) [13]. Hierbei vergrößert sich in den ersten zwei Wochen nicht nur der Umfang des infarzierten sondern auch der des nicht-infarzierten Gebietes im Sinne einer exzentrischen Hypertrophie [14].

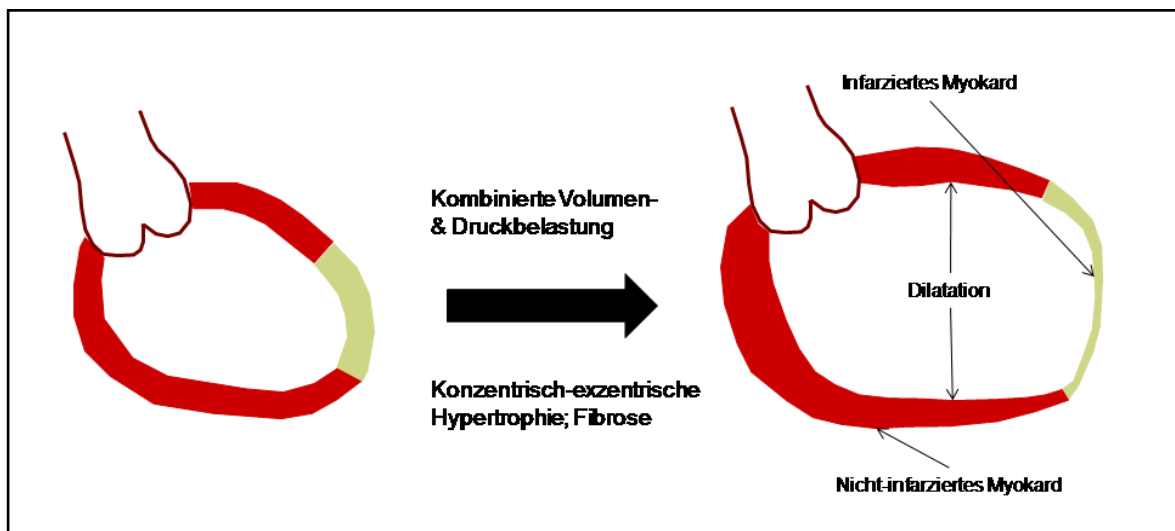


Abb. 1: Remodelingprozesse des Herzens im Tiermodell nach experimentell induzierten Infarkt. (Bearbeitet nach Opie 2006)

Das *Remodeling* kann sich durchaus günstig auswirken, etwa wenn die initiale Narbenbildung die Pumpfunktion des linken Ventrikels auf Kosten eines erhöhten

linksventrikulären Volumens aufrechterhält [15]. Die Kompensationsmechanismen sind allerdings begrenzt. Die Gefahr einer progressiven Dilatation des linken Ventrikels steigt mit zunehmender Infarktgröße. Patienten, bei denen nach Myokardinfarkt keine oder eine nur beschränkte Dilatation auftritt, welche sich innerhalb von 4 Wochen selbst limitiert, bleiben in der Regel stabil. Demgegenüber führt eine progressive Dilatation bei großem Infarkt aufgrund der Dilatation und des Funktionsverlustes des zuvor noch funktionsfähigen Myokards zum steten Abfall der linksventrikulären Ejektionsfraktion (LVEF) [16]. Die Form des Herzens geht von einer eher eliptischen in eine kugelige über [17].

Die Zellen, die am stärksten an diesen Umbauprozessen beteiligt sind, sind die Kardiomyozyten. Weitere Strukturen oder Zelltypen sind das Interstitium, Fibroblasten und das Gefäßsystem des Herzens. Infolge des Myokardinfarkts sinkt die Zahl der Kardiomyozyten im linken Ventrikel zunächst durch Nekrose im Infarktgebiet und im weiteren Verlauf durch Apoptose im vitalen Myokard. Die überlebenden Kardiomyozyten hypertrophieren und elongieren (Abb. 2), ausgelöst durch die erhöhte Wandspannung. Die kapilläre Dichte verringert sich in Folge der hypertrophen Kardiomyozyten und der interstitiellen Fibrose. Diese Veränderungen bleiben auch nach einem Monat nachweisbar. Eine erhöhte Wandspannung, hervorgerufen durch die Myokardhypertrophie in Kombination mit einer verringerten Perfusion durch verminderte Kapillarzahl, resultiert in einer Unterversorgung mit Energieträgern und Sauerstoff. Es entsteht ein *Circulus vitiosus* aus erhöhter Wandspannung, Hypertrophie, Ischämie und Kardiomyozytendysfunktion [12, 18].

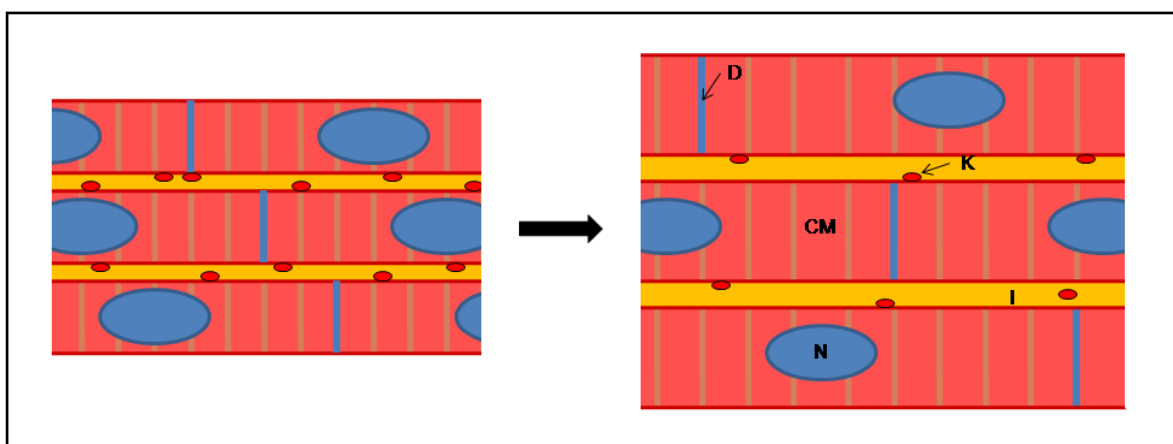


Abb. 2: Mikroskopische Vorgänge beim *Remodeling*: Hypertrophie und Längenzunahme der Kardiomyozyten, interstitielle Kollageneinlagerung, Abnahme der kapillären Dichte; **CM** Kardiomyozyten, **D** *Discus intercalaris*, **I** Interstitium, **K** Kapillare, **N** *Nucleus*

Neben der Hypertrophie spielt die Fibrose in der Pathogenese der linksventrikulären Dysfunktion eine wichtige Rolle. Mit dem Infarkt werden die Fibroblasten stimuliert und damit die Kollagensynthese. Die Fibrose breitet sich vom perivaskulären Raum auf das Interstitium aus. Diese sogenannte reaktive Fibrose ist hauptsächlich im ungeschädigten Myokard zu beobachten. Zu Grunde gehende Kardiomyozyten werden durch Bindegewebe ersetzt (Ersatzfibrose). Die direkte Konsequenz ist die Versteifung des linken Ventrikels und somit Verminderung der diastolischen *Compliance*. Indirekt führt die perivaskuläre Fibrose zusammen mit der Myozytenhypertrophie zu einem gestörten ATP-abhängigen Kalziumstoffwechsel mit der Folge einer Störung der aktiven Relaxation am Beginn der Diastole [19, 20].

Auf der molekularen Ebene beeinflussen verschiedenste Faktoren wie adrenerge Aktivierung, Angiotensin II, Aldosteron und Zytokine das kardiale *Remodeling* nach Infarkt. Die Aktivierung des adrenergen Systems hat initial die Aufgabe, die Herzfunktion und Gewebedurchblutung zu erhalten. Langfristig hat es aber negative Einflüsse auf die Herzfunktion. So korrelieren erhöhte Norepinephrinplasmalevel als Ausdruck der adrenergen Aktivierung mit einer ungünstigeren Langzeitprognose von Patienten mit Herzinsuffizienz [21].

Angiotensin II wird im Herzen als Antwort auf myokardiale Dehnung ausgeschüttet. Via AT1-Rezeptoren der Kardiomyozyten und Fibroblasten bewirkt es eine Hypertrophie und Fibrose [22]. Die durch Angiotensin II erhöhten Aldosteronlevel haben hämodynamische Konsequenzen und stimulieren ebenfalls die Kollagensynthese der herzeigenen Fibroblasten [23].

Die Zytokine, vor allem TNF- α (Tumornekrosefaktor), IL-1 β (Interleukin), IL-6 und TGF- β , (*Transforming growth factor beta*) werden bei ischämischer Myokardschädigung, mechanischem Stress und durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS: *reactive oxygen species*) getriggert ausgeschüttet. Die Zytokinausschüttung wird verstärkt durch einen positiven Rückkopplungsmechanismus und das Anlocken von Entzündungszellen, die wiederum Zytokine ausschütten. Akut kommt es zu einer progressiven Myozytenapoptose und -hypertrophie sowie verminderter Kontraktilität. Chronisch wird die Zusammensetzung der Extrazellulärmatrix (EZM) und die Gefäß- und Herzgeweberegeneration beeinflusst [24].

In einem Rattenmyokardinfarktmodell konnten Sun *et al.* zeigen, dass die TGF- β -1-Konzentration im gesamten Myokard erhöht war. Die Höhe der TGF- β -1-mRNA-Expression korrelierte mit dem Ausmaß der Fibrose. Die Expression konnte durch Inhibitoren des *Angiotensin converting enzyme* (ACE-Inhibitoren) und AT1-

Rezeptorblocker vermindert werden. Es ist zu vermuten, dass Angiotensin II eine wichtige Rolle in der Stimulation von TGF- β spielt [25]. Im zeitlichen Verlauf früh nach dem Infarkt werden die Isoformen TGF- β -1 und -2 stärker exprimiert, während TGF- β -3 später und länger exprimiert wird [26]. Beschriebene Effekte sind die erhöhte Synthese von extrazellulären Matrixproteinen bei gleichzeitiger Hemmung der MMPs (matrixdegradierenden Matrixmetalloproteinasen) durch TIMP (*Tissue inhibitors of metalloproteinases*) und PAI-1 (Plasminogen-Aktivator-Inhibitor). Somit begünstigt TGF- β eine Fibrose [27]. Zusätzlich induziert TGF- β -1 eine Hypertrophie der Kardiomyozyten [28].

Um das Langzeitüberleben nach Myokardinfarkt zu verbessern, gilt es das kardiale *Remodeling* zu verringern. Neben einer medikamentösen Therapie, etwa mit ACE-Hemmern und Betablockern, kommen auch zelluläre Therapien infrage. In den letzten 10 Jahren sind die humanen multipotenten mesenchymalen Stromazellen (MSC) in den Fokus der Forschung gerückt.

1.3. Humane Multipotente Mesenchymale Stromazellen

Multipotente mesenchymale Stromazellen (MSC) sind Zellen mesodermalen Ursprungs, welche die Fähigkeit zur (begrenzten) Selbsterneuerung, Proliferation und Differenzierung in Geweben des mesodermalen Keimblattes besitzen. Der frühere Begriff „mesenchymale Stammzellen“ wurde aufgegeben, da die derzeitige experimentelle Datenlage keine sichere Einschätzung erlaubt, ob MSC alle Stammzeleigenschaften besitzen [29, 30]. Trotzdem sind sie vielversprechende Kandidaten für die therapeutische Reperatur von Geweben mesenchymalen Ursprungs. Im Gegensatz zu embryonalen Stammzellen sind sie ethisch weitgehend unproblematisch, einfach und in großer Zahl zu gewinnen und haben eine geringe Immunogenität [31].

Die Internationale Gesellschaft für Zelltherapie hat im Jahr 2006 die Minimalkriterien vorgeschlagen, welche MSC definieren: (1) Adhäsion auf Kunststoffoberflächen unter Standardkulturbedingungen (2) spezifische Kombination von Oberflächenmolekülen, wie CD73, CD90 und CD105 unter der Voraussetzung, negativ für CD14, CD34 und CD45 oder CD11b, CD79 α oder CD19 und HLA-DR zu sein sowie (3) dem Potential, *in vitro* zu Knochen, Knorpel und Fettgewebe zu differenzieren [32].

Die drei wesentlichen Quellen zur Gewinnung von MSC sind Knochenmark [33], Fettgewebe [34] und Nabelschnurblut [35]. Es gelang aber auch, aus Skelettmuskulatur,

Gehirn [36], Spongiosa [37], Lunge [38] und Haut [39] vergleichbare Zellen zu isolieren. Die MSC aus Knochenmark, Fettgewebe und Nabelschnurblut wurden durch Kern *et al.* [40] hinsichtlich ihrer Eigenschaften untersucht. Morphologisch und immunphänotypisch konnten keine wesentlichen Unterschiede gefunden werden. Allerdings fehlte den MSC aus Nabelschnurblut (CB-MSC) die Fähigkeit zur Fettgewebisdifferenzierung. Demgegenüber beobachtete eine andere Arbeitsgruppe bei CB-MSC sehr wohl Merkmale von Fettzellen nach Induzierung, wenn auch in geringerem Ausmaß als bei MSC aus dem Knochenmark (BM-MSC) [41]. Vorteile von CB-MSC sind die hohe Proliferationskapazität, lange Kulturzeit und für die Patienten wenig belastenden Gewinnung. BM-MSC zeigen die kürzeste Kulturzeit und das niedrigste Proliferationspotential.

Welche Funktion MSC im Organismus haben und wo genau sie überhaupt zu finden sind, ist derzeit noch Gegenstand der Forschung. Problematisch ist in diesem Falle, dass es keinen eindeutigen Marker gibt, der MSC beispielsweise in Gewebsschnitten identifizieren könnte. Somit kann man nur versuchen Zellen, zu isolieren und testen, ob sie die oben genannten Kriterien für MSC erfüllen. Ein mögliches MSC-Äquivalent sind die Perizyten, welche Kapillaren und kleinste Gefäße umgeben. Crisan *et al.* [42] isolierten Perizyten aus verschiedensten Geweben, darunter Knochenmark, Muskel, Plazenta Fettgewebe, Lunge und Gehirn. Für diese Zellen konnten sie sowohl nativ und nach Kultivierung MSC-typische Marker als auch osteogenes, chondrogenes, adipogenes und myogenes Differenzierungspotential nachweisen. Da Perizyten in praktisch allen Organen vorkommen, würde dies auch den Nachweis von MSC in den verschiedensten Geweben erklären.

Neben der Fähigkeit, Knochen-, Knorpel- und Fettgewebe zu bilden (Abb. 3), gibt es auch Berichte über die Differenzierung in andere mesenchymale Gewebe, wie Skelettmuskel, Sehne und Kardiomyozyten [43-45]. Eine Transdifferenzierung über das mesodermale Keimblatt hinaus ist fraglich. So konnten zwar Hofstetter *et al.* [46] die Umwandlung von MSC in neuronenhähnliche Zellen beobachten, diese waren aber nicht in der Lage Aktionspotentiale zu erzeugen.

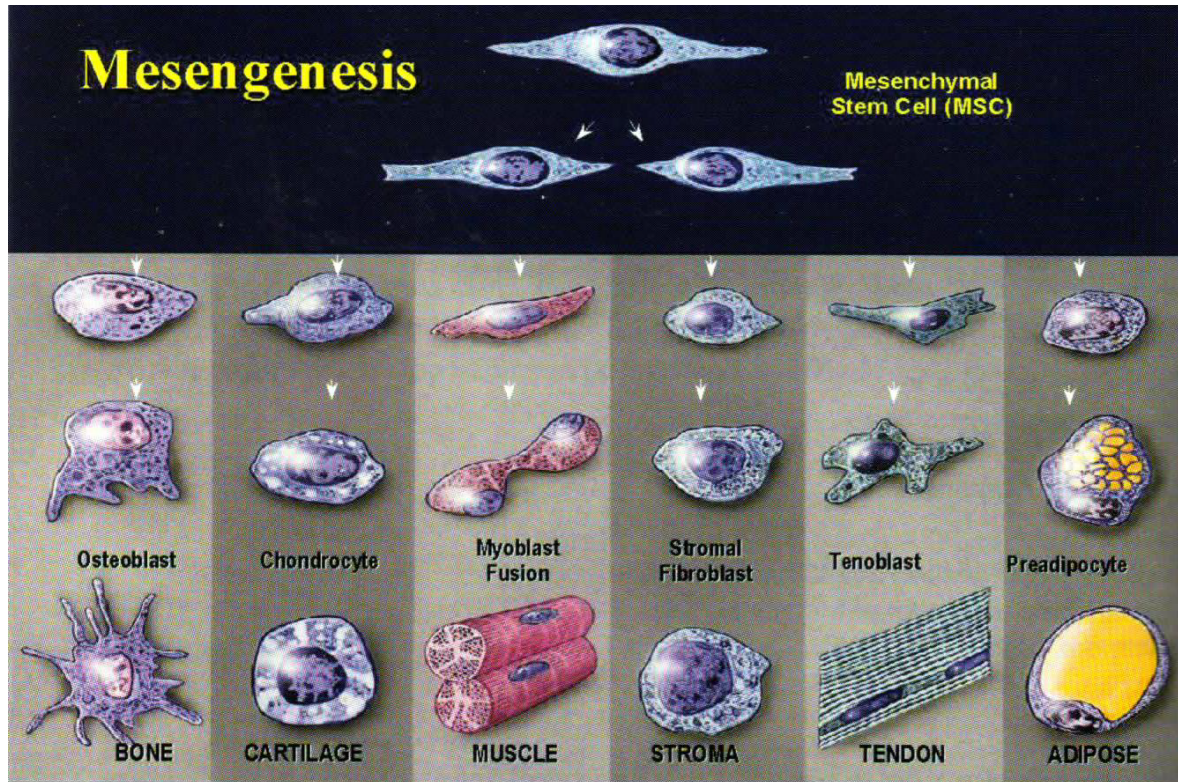


Abb. 3: Differenzierungswege von MSC (entnommen aus: Mesenchymal stem cells of human adult bone marrow. Pittenger, Mark und Marshak, Daniel in: Stem cell biology. Marshak, Daniel; Gardner, Richard und Gottlieb, Daniel; New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001)

Neben ihrer geringen Immunogenität besitzen MSC auch immunmodulatorische Eigenschaften. So sind sie in der Lage, die Proliferation von alloreaktiven T-Zellen zu unterdrücken [47]. In einem Hirnischämiemodell der Maus interagierten die MSC mit den Immunzellen, schwächten die Entzündungsreaktion, die Immunantwort und die Apoptoserate ab [48]. An Mäusen mit einer experimentellen autoimmunen Enzephalitis, einem Modell für Multiple Sklerose, bewirkte die Injektion von MSC einen Rückgang der Entzündung, der Demyelinisierung und eine veränderte Zytokinsekretion der T-Lymphozyten [49]. Bezieht man dies nun auf die Behandlung eines akuten Ereignisses, wie etwa eines Herzinfarktes, wären Therapien mit allogenen MSC möglich, welche gleichzeitig die lokale Entzündungsreaktion und die Apoptose minimieren. Tatsächlich konnten Du *et al.* zeigen, dass MSC in einem Myokardinfarktmodell der Ratte die lokale Entzündungsreaktion abschwächen. Die Aktivität von NF-kappa B wurde inhibiert, die Produktion von TNF- α und IL-6 reduziert und die Expression von antiinflammatorischen IL-10 erhöht [50].

1.4. MSC in der Therapie des Herzinfarkts

Die Behandlung eines Myokardinfarkts durch MSC hat bereits in Klein- [45] und Großtierexperimenten [51] vielversprechende Ergebnisse gezeigt. Die kontraktile Dysfunktion, die Infarktgröße und das kardiale *Remodeling* konnten reduziert werden. Die Apoptoserate in der Infarktgrenzzone sank und die Neubildung von Gefäßen wurde stimuliert. Die Integration der MSC in das bestehende Myokard verlief ohne gravierende Nebenwirkungen, unabhängig ob die Behandlung durch intramyokardiale, intrakoronare, transendokardiale oder intravenöse (systemische) Injektion erfolgte.

Über welchen Mechanismus MSC diese Effekte bewirken, ist noch nicht abschließend geklärt. Diskutiert wird einerseits die Transdifferenzierung von MSC zu Kardiomyozyten und Endothelzellen, andererseits bewirken MSC verschiedene parakrine Effekte. Diese lassen sich nach da Silva Meirelles [52] wie folgt einteilen:

- Trophisch
 - Antiapoptotisch
 - Proliferations- und/oder differenzierungsfördernd
 - Angiogenetisch
- Immunmodulatorisch
- Chemoattraktiv
- Antifibrotisch.

Einzelne Gruppen berichten von der spontanen Transdifferenzierung der MSC zu kardiomyozytenähnlichen Zellen *in vivo* [45, 51]. Um die MSC *in vitro* zur Transdifferenzierung anzuregen, wurden verschiedene Strategien verfolgt. Eine epigenetische Modifikation durch 5-Azazytidin, welches die DNA-Stabilität vermindert, führt zu spontan schlagenden kardiomyozytenähnlichen Zellen, welche morphologisch, funktionell und phänotypisch Kardiomyozyten entsprechen [53], und auch eine vegetative Rezeptorausstattung besitzen [54]. Eine andere Herangehensweise ist die Co-Kultivierung mit Kardiomyozyten [55] oder deren Extrakten [56]. Die Fähigkeit von MSC, sich zu Kardiomyozyten umzuwandeln, hängt außerdem von ihrer Herkunft ab. Humane MSC des Endometriums und weiße Fettzellen haben ein hohes kardiomyogenes Transdifferenzierungspotential [57, 58]. Bei MSC aus Nabelschnurblut hingegen konnte es noch nicht nachgewiesen werden [59]. Inwieweit die transdifferenzierten MSC allerdings zur funktionellen Regeneration des Herzmuskels beitragen, ist umstritten. Sie lassen sich zwar bis zu 2 Jahre im Myokard nachweisen, aber nur ein geringer Teil (0,01

bis 9 %) transdifferenziert wirklich *in vivo* zu Kardiomyozyten [60, 61], sodass deren Beitrag zur kardialen Regeneration als eher gering einzuschätzen ist. Ebenso verhält es sich mit der Transdifferenzierung zu Endothelzellen. Diese lässt sich zwar nachweisen, kann aber nicht das Ausmaß der Neoangiogenese erklären [62].

Viel wichtiger sind wahrscheinlich die parakrinen Effekte. Shabbir und Kollegen führten dazu ein interessantes Experiment durch: In einem Herzinsuffizienzmodell der Maus injizierten sie MSC oder MSC-konditioniertes Medium in eine Skelettmuskelloge. Die MSC waren somit ortsständig. Trotzdem wirkte sich die Behandlung positiv auf die Herzmuskelfunktion aus und reduzierte Apoptose und Fibrose. Es erhöhte sich die Zahl der Zellkerne von Kardiomyozyten und Endothelzellen im Herzen [63]. MSC sezernieren eine Vielzahl von Faktoren (Abb. 4).

Um die Effektivität der MSC-Therapie zu erhöhen, gibt es verschiedene Ansätze. Diese lassen sich unter Präselektionierung, Präkonditionierung, genetischer Modifikation und adjuvanter Therapie zusammenfassen. Psaltis *et al.* [64] selektionierten MSC mit STRO-1 (Stromal precursor antigen) und konnten damit das Differenzierungspotential, die Proliferationskapazität und die parakrine Aktivität steigern. Eine andere vielversprechende Methode ist die hypoxische/anoxische Präkonditionierung. Derartig vorbehandelte MSC wirken verstärkt antiapoptotisch und angiogenetisch und verbessern das *Outcome* nach tierexperimentellem Myokardinfarkt [65-67]. Ähnliche Ergebnisse konnte die Gruppe um Li *et al.* [68] vorlegen, indem sie Ratten-MSC genetisch modifizierte, welche daraufhin Bcl-2 überexprimierten.

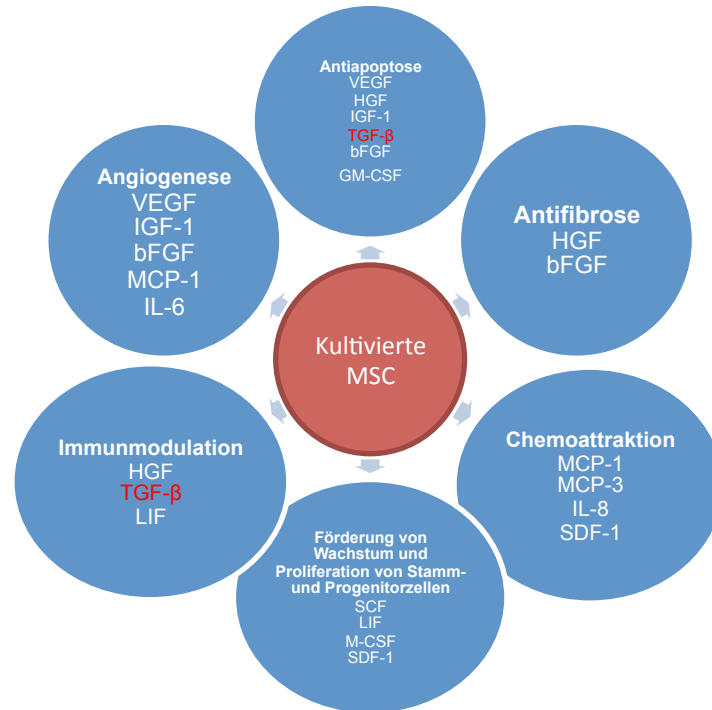


Abb. 4: Übersicht der parakrinen Effekte von MSC und der entsprechenden Faktoren. (bearbeitet nach da Silva Meirelles [52])

Obwohl MSC als wenig immunogen gelten, kann es zu einer moderaten lokalen Inflammation bei xenogener Transplantation kommen. Die Immunantwort *in vitro* kann durch vorherige Sensibilisierung mit xenogenen MSC noch verstärkt werden [69]. Entsprechend kann das Überleben von humanen MSC (hMSC) in Rattenherzen durch Immunsuppression verlängert werden [70].

Es liegen bisher erst wenige klinische Studien vor, welche die Effekte von MSC in der Herzinfarkttherapie untersuchen. Die erste veröffentlichte klinische Studie mit 69 Patienten stammt aus dem Jahr 2004 und wurde in Nanjing, China, durchgeführt [71]. Chen und Kollegen injizierten autologe MSC aus dem Knochenmark intrakoronar bei Patienten mit AMI. Drei und sechs Monate nach Intervention war die linksventrikuläre Funktion in der MSC-behandelten Gruppe signifikant besser als in der Kontrollgruppe. Über schwere MSC-bedingte Nebenwirkungen wurde während des sechsmonatigen Beobachtungszeitraumes nicht berichtet, insbesondere über keine Arrhythmien. Daten einer Langzeitbeobachtung dieser Patienten wurden allerdings nicht veröffentlicht. Für eine klinische Applikation werden dem betroffenen Patienten autologe MSC entnommen, kultiviert und reinfundiert. Dabei hängt die Qualität der Stammzellen vom Alter, Gesundheitszustand und der genetischen Ausstattung des Patienten ab. Allogene MSC hätten den Vorteil, sofort verfügbar und optimal ausgewählt zu sein. Allerdings haftet

ihnen der Nachteil an, eine moderate Entzündungsreaktion auszulösen. Die erste klinische randomisierte Studie mit allogenen MSC wurde 2009 von Hare und Kollegen publiziert [72]. Die Studie umfasste insgesamt 53 Patienten. Der primäre Endpunkt während des sechsmonatigen Beobachtungszeitraums waren therapieassoziierte Nebenwirkungen. Die intravenös injizierten MSC bildeten weder ektope Gewebe oder Tumore noch traten mehr Nebenwirkungen als in der Kontrollgruppe auf. Die Zahl der Arrhythmien und ventrikulären Tachykardien war sogar geringer. Entsprechend den Tierexperimenten konnte gegenüber der Kontrollgruppe eine verbesserte linksventrikuläre Ejektionsfraktion, verminderte Wandausdünnung und *Remodeling* beobachtet werden.

1.5. CD105 (Endoglin)

CD105 oder Endoglin ist ein 180 kDa schweres membranständiges Glycoprotein in Form eines Homodimers, welches über Disulfidbrücken verbunden ist [73, 74]. Exprimiert wird es von den verschiedensten Zellen: darunter Endothelzellen, vaskulären glatten Muskelzellen, mesenchymalen Stammzellen, Endokardzellen, aktivierten Makrophagen und Leukämiezellen [74-78]. Es gehört zur Gruppe der Typ-III-Transforming-Growth-Factor- β -Rezeptoren und bindet mit hoher Affinität Transforming-Growth-Factor- β (TGF- β) 1 und 3. Dabei interagiert es mit den TGF- β -Rezeptoren I und II (T β RI und II) [79, 80]. Die zwei bekannten Isoformen L- und S-Endoglin, unterscheiden sich in ihrer zytoplasmatischen Domäne und in ihrem Verteilungsmuster in den Geweben [81, 82]. Die längere L-Form dominiert auf Endothelzellen und hat eine höhere Phosphorylierungskapazität [83].

Möglicherweise kommt CD105 eine wichtige Rolle in der Vaskulogenese zu. McAllister *et al.* [84] identifizierten eine Mutation des Endoglin-Gens (9q3) als Ursache der Hereditären Hämorrhagischen Teleangiektasie 1 (HHT1). Dabei handelt es sich um eine autosomal dominant vererbte Krankheit, die durch multisystemische Gefäßdysplasien und rezidivierende Hämorrhagien gekennzeichnet ist. CD105-*Knockout*-Mäuse sterben zwischen Gestationstag 10 und 10,5 aufgrund von Defekten in der Gefäß- und Herzentwicklung. Die Reifung des Dottersackgefäßplexus bleibt aus. Die Folge sind Hämorrhagien. Die Herzentwicklung stoppt an Tag neun und ist gekennzeichnet durch eine gestörte Klappenentwicklung, fehlende mesenchymale Transformation und Herzkissenbildung [85]. Haploinsuffiziente Mäuse (Eng^{+/-}) überleben, imponieren aber mit fokalen Hämorrhagien in Leber, Lunge und Hirn sowie Teleangiektasien. Am Herzen wurde über hypertrophische Ventrikel und Koronararterien berichtet. Der

Ausprägungsgrad der HHT1 wird wahrscheinlich noch durch andere Gene beeinflusst, da der Phänotyp sehr unterschiedlich ausfällt [86, 87].

Wang *et al.* [88] konnte CD105 auf Endothelzellen von Tumoren, fetalen Organen sowie auf regenerierenden und entzündeten Geweben nachweisen. In Gehirnen von Patienten mit Schlaganfall waren die Anzahl der CD105-positiven Gefäße und die Farbtintensität in der Penumbra der Ischämiezone deutlich höher als in korrespondierenden gesunden Hirnanteilen. Die gleichen Endothelzellen waren auch positiv für VCAM-1 (*Vascular cell adhesion molecule*) einem Marker für die Endothelzellaktivierung [89]. Ähnliches ist am Herzen nach AMI (Mensch und Maus) zu beobachten. Die neu gebildeten Mikrogefäße im Infarktgebiet zeigten eine Hochregulierung von CD105 [90]. Da im Vergleich Endothelzellen in normalen Geweben weniger Endoglin exprimieren und proliferierende HUVEC mehr als konfluente, ist Endoglin als ein proliferationsassoziierter Marker anzusehen [91]. Damit wurde Endoglin interessant für die Krebsforschung. Und tatsächlich erwies sich, dass CD105 bei der histochemischen Auswertung von Mammacarcinomen ein unabhängiger prognostischer Faktor für das Überleben und das krankheitsfreie Intervall war [92]. Auch als Ansatz zur Therapie für Neoplasien wird CD105 diskutiert. Da es, wie schon erwähnt, verstärkt auf Endothelzellen proliferierender Gewebe exprimiert wird, eignet sich CD105 zum Attackieren der Gefäßversorgung und Gefäßneubildung von Tumoren. Hierbei erwiesen sich in Mausmodellen sowohl immunotoxin- als auch radioimmunkonjugierte CD105-Antikörper als erfolgreich und führten zu einer Regression [93, 94] oder zumindest einer Wachstumsverlangsamung der Tumore [95].

Die Wirkmechanismen zwischen CD105 und Zelle werden intensiv erforscht und deuten auf ein komplexes Zusammenspiel hin. Endoglin fungiert als Hilfsrezeptor für die T β R I und II [96] und moduliert so die Signalübertragung von TGF- β . Im Gegensatz zu Betaglycan, mit dem es zu 71% strukturhomolog ist, bindet es nur TGF- β 1 und TGF- β 3, nicht aber TGF- β 2 [79]. Für die Bindung des Liganden ist die Assoziation mit T β R II notwendig [96]. Damit TGF- β seine Wirkung entfalten kann, sind zwei verschiedene Signalwege für T β R I in Endothelzellen beschrieben worden (Abb. 5): via den Transkriptionsfaktoren ALK-5 (*Activin receptor-like kinase*) und Smad 2/3 sowie via ALK-1 und Smad 1/5. Der T β R I-ALK-5-Signalweg führt über die Phosphorylierung von Smad 2/3 zur heteromeren Komplexbildung mit Smad 4. Dieser Transkriptionsfaktorkomplex bewirkt eine Inhibition der Zellproliferation und -migration. Die Aktivierung des ALK-1-Signalweges hat als Ergebnis eine Phosphorylierung von Smad 1/5 und gleichfalls die Bildung eines Komplexes mit Smad 4 zur Folge. Durch diesen Komplex kommt es allerdings auf der

Transkriptionsebene zu einer Aktivierung von proliferations- und migrationsassoziierten Genen. CD105 verschiebt das Gleichgewicht in Richtung des ALK-1-Signalweges und damit in Richtung Endothelzellproliferation und -migration [97].

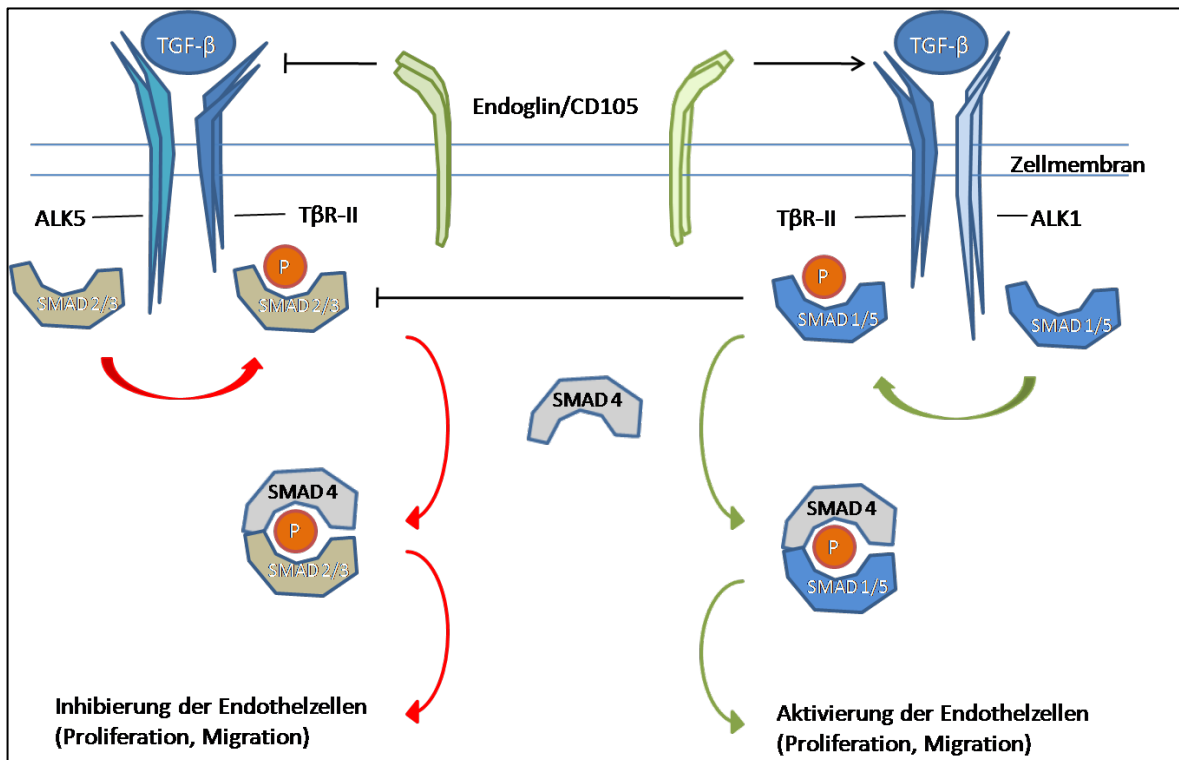


Abb 5: Signalweg von CD105/Endoglin in Endothelzellen.

Arbeiten mehrerer Autoren weisen darauf hin, dass CD105 eine Bedeutung hinsichtlich geschädigter Arterien zukommt. So sind vaskuläre glatte Muskelzellen arteriosklerotischer Plaques *in vivo* endoglinbeladen, während glatte Muskelzellen gesunder Arterien kein membrangebundenes CD105 aufweisen. *In vitro* führte die Gegenwart von TGF-β1 zu einer Hochregulierung von CD105 in humanen aortalen glatten Muskelzellen [98]. Durch experimentelle Schädigung von Koronararterien mit Ballondilatation in Schweinen ließ sich eine Überexprimierung von CD105 in Endothelzellen, Myofibroblasten und glatten Muskelzellen induzieren. In arteriosklerotischen humanen Koronararterien wurde ebenfalls ein höherer Anteil von Endoglin nachgewiesen als in gesunden Arterien. Auf zellulärer Ebene hemmt CD105 die Migration von glatten Muskelzellen durch Antagonisierung von TGF-β [99]. CD105 scheint also eine Rolle in der Wahrung der Gefäßintegrität nach Schädigung zu spielen.

Nicht nur die Gefäßintegrität sondern auch der Gefäßtonus kann durch CD105 beeinflusst werden. Es wurde als Bestandteil der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) identifiziert. Bei einer Haploinsuffizienz für CD105 (Eng^{+/-}) ist die eNOS-Expression, die NO-Synthese und die Vasodilatation herabgesetzt [100]. Gleichzeitig reguliert CD105

auch die Expression von COX-2 (*Cyclooxygenase*) und moduliert damit das feine Zusammenspiel zwischen eNOS und COX-2 [101].

Bei verschiedenen Zelltypen propagiert CD105 vor allem die Zellmigration, Proliferation und Adhäsion [100, 102, 103]. In CD105-defizienten HUVEC war die Fähigkeit zur Ausbildung von kapillarähnlichen Röhren reduziert, während die Zellmortalität erhöht war. Das Wachstum und die Migration in Gegenwart von TGF- β waren stärker inhibiert als in nicht CD105-supprimierten Zellen. Dies stützt wiederum die These, dass CD105 die TGF- β -Wirkung antagonisiert [103]. Ähnliches zeigte sich in murinen Endothelzellen, die verschiedenen Stimuli zur Angiogenese ausgesetzt waren. Hier reagierten die heterozygoten Zellen schwächer als normale Endothelzellen. *In vivo* waren die kapilläre Neubildung und die Reperfusion nach Ischämie der Hinterbeine reduziert [100]. In einem Myokardinfarktmodell der Maus war die Angiogenese im Infarktgebiet von heterozygoten Mäusen niedriger im Vergleich zu Wildtypmäusen [90].

Unter Hypoxiebedingungen werden die Promotoraktivität des Endoglins, die Transkription und die Expression von CD105 gesteigert. Dieser Effekt ist in der Gegenwart von TGF- β umso stärker ausgeprägt. Die Folge ist ein antiapoptotischer Effekt auf die Zellen [22, 104]. Übereinstimmend damit konnten Warrington *et al.* [105] an murinen und humanen Endothelzellen zeigen, dass nach Bestrahlung und Hypoxie in CD105-defizienten Zellen der proapoptotische Marker p53 stärker und der antiapoptotische Marker Bcl-2 (*B-cell lymphoma*) weniger exprimiert war.

Tabelle 1: Funktion, Eigenschaften und Vorkommen von CD105/Endoglin

Funktion	<ul style="list-style-type: none">• Bindung von TGF-β I und III• Hilfsrezeptor der TGF-β-Rezeptoren I und II• Modulation des TGF-β-Signals
Vorkommen	<ul style="list-style-type: none">• Mesenchymale Stammzellen• Endothelzellen• Glatte Muskelzellen• Endokardzellen• Makrophagen u.a.
Eigenschaften	<ul style="list-style-type: none">• Antiapoptotisch• proangiogenetisch• Hochreguliert unter Hypoxie• Fördert:<ul style="list-style-type: none">◦ Endothelzellproliferation und -migration◦ Zelladhäsion

1.6. Voraussetzungen und Ziele

Multipotente mesenchymale Stromazellen haben ihr regeneratives Potential nach Myokardinfarkt in einer Vielzahl von Experimenten und einigen klinischen Studien bewiesen. In dieser Arbeit soll untersucht werden, inwieweit eine Präselektionierung von CD105-positiven hMSC aus Nabelschnurblut die Effekte verbessern kann. Insbesondere soll die Wirkung von CD105 auf die Angiogenese im Herzen *in vitro* und *in vivo* beleuchtet werden. Lässt sich dadurch ein verbessertes Überleben der MSC unter hypoxischen Bedingungen, ähnlich der Perinfarktzone, erreichen? Weiterhin soll überprüft werden, ob CD105 als Modulator der TGF- β -Signalübertragung das pathologische *Remodeling* des Herzens verringern kann.

2. Material und Methoden

2.1. Tiere und Tierhaltung

Bei der verwendeten Tierart handelt es sich um C.B-17 SCID-Mäuse (Nomenklatur: C.B-17//lcr-*Prkdc*^{scid}//lcr/coCrI, Charles River, Deutschland). Die Tiere waren in der prä- und postoperativen Phase im Institut für experimentelle Chirurgie der Medizinischen Fakultät an der Universität Rostock untergebracht. Sie wurden in Käfigen mit freiem Zugang zu Wasser und sterilem Standardfutter gehalten. Spezielle Holzfasern (Fa. Altron) und Zellstoff dienten als Streu bei regelmäßigem Wechsel. In den Räumen herrschte ein 12-Stunden-Tag-Nacht-Zyklus.

Der Antrag zur Durchführung von Tierversuchen mit definierten hMSC beim Herzinfarkt wurde am 03.09.2007 beim Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern eingereicht und am 26.09.2007 genehmigt (Aktenzeichen LALLF M-V/TSD/7221.3-1.1-036/07).

2.2. Versuchsdurchführung

2.2.1. Experimentelles Design

SCID-Mäuse (männlich, 20±1 g) wurden nach dem Zufallsprinzip einer der drei folgenden Gruppen zugeordnet:

- Herzinfarktkontrollgruppe (MI-C, n = 10)
- Herzinfarkt behandelt mit humanen mesenchymalen Stammzellen aus Nabelschnurblut (MI-CB, n = 10)
- Herzinfarkt behandelt mit CD105-angereicherten humanen mesenchymalen Stammzellen aus Nabelschnurblut (MI-CB105, n = 10).

Sechs Wochen nach der Operation wurden die Mäuse euthanasiert und die Herzen zur histologischen Auswertung weiterverarbeitet.

2.2.2. Vorbereitung und Durchführung der Operation

Die Mäuse wurden durch die intraperitoneale Applikation von Tribromethanol (Avertin® 0,35 mg/kg) anästhesiert. Der Thorax wurde rasiert. Die Augen sollten durch Auftragen von Bepanthen®-Creme (Roche, Grenzach) vor dem Austrocknen geschützt werden. Für

die Operation wurde die Maus in Rückenlage auf einer Wärmeplatte durch Klebestreifen fixiert und die Körpertemperatur über eine Rektalsonde kontrolliert. Die endotracheale Intubation erfolgte unter Spontanatmung. Der Mouse Ventilator MiniVent Type 845 (Hugo Sachs Apparatus GmbH) diente als Beatmungsgerät. Die Maus wurde mit 120 Atemzügen pro Minute und einem Tidalvolumen von 180 µl beatmet. Zur Überprüfung der Herzfunktion und zur Erfolgskontrolle der späteren Koronararterienligatur erfolgte eine kontinuierliche EKG-Überwachung.

Der Hautschnitt wurde in Höhe des 4. Interkostalraumes gesetzt, die Muskelfaszie mobilisiert und die Mm. pectorales transversal durchtrennt. Nach dieser linkslateralen Thorakotomie wurde das Perikard gefenstert. Unmittelbar distal des linken Herzhohes wurde nun die linke absteigende Vorderwandarterie (LAD = left anterior descending) umstoßen und permanent ligiert (Prolene 8-0, Ethicon). Als Erfolgskontrolle für die Induktion eines Infarktes dienten typische EKG-Veränderungen und die Abblässung des Infarktgebietes (siehe Abb. 6). Direkt im Anschluss an die Ligation des LAD erfolgte die Injektion von 400.000 hCB-MSC suspendiert in BD Matrigel® Matrix beziehungsweise BD Matrigel® Matrix allein. Injiziert wurden in die Grenzzone zwischen Infarkt (abgeblasst) und vitalem Myokard vier Mal 5 µl mit einer speziellen Kanüle mit epikardialen Stopper um eine Herzwandperforation zu verhindern. SHAM-operierte Tiere erhielten zwar die Matrigelinjektion aber keinen Herzinfarkt.

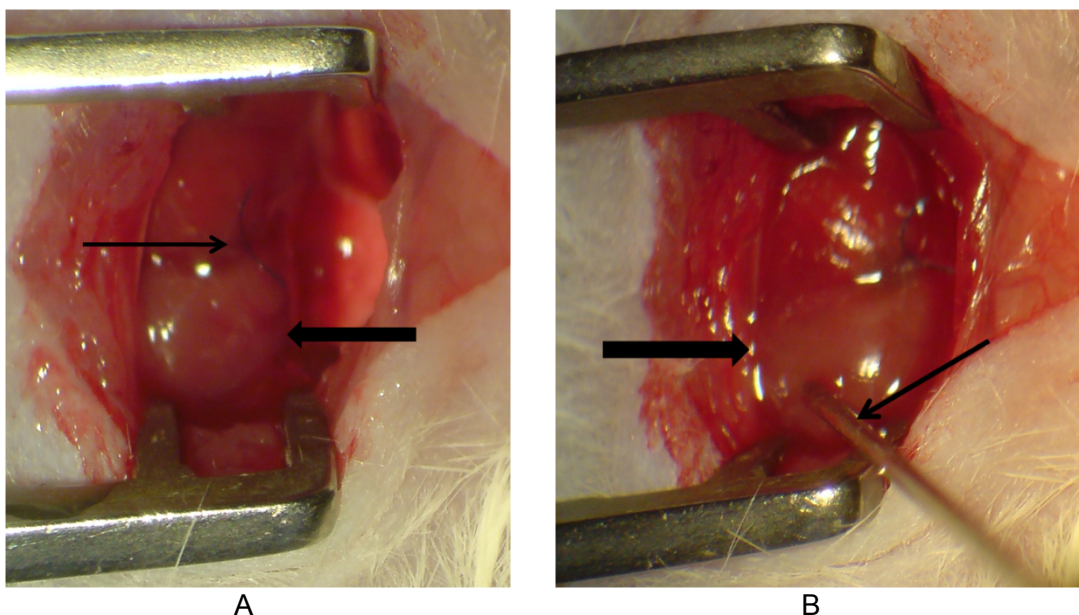


Abb 6: A: Aufsicht auf das Mäuseherz nach Ligatur (dünner Pfeil) mit sichtbar abgeblassten Infarktgebiet (dicker Pfeil), B: Injektion (dünner Pfeil) der MSC in die Grenzzone des Infarktes (dicker Pfeil).

Nach Entlüftung der Pleurahöhle mittels Überdruckbeatmung wurde der Thorax mit

Prolene 8 – 0 verschlossen. Die Adaptation der Muskelschichten und der dazugehörigen Faszie geschah mit dem gleichen Nahtmaterial. Zum Schluss wurde die Haut mit einer resorbierbaren Naht (Safil violett, DS 19, BBraun) verschlossen.

Zur postoperativen Analgesie wurde Novaminsulfon (4 Tropfen/300 ml Wasser) verabreicht.

Nach Ablauf von sechs Wochen wurden die Tiere schließlich durch Gabe von 5 % KCl-Lösung euthanasiert, die Herzen entnommen und kryokonserviert.

2.2.2.1. Materialien

Tabelle 2: Für die operative Versuchsdurchführung benötigte Materialien

Bezeichnung	Spezifikation/Kat.-Nr.	Firma
OP-Platte, beheizbar	HI 1220	Leica
Stereo-OP-Mikroskop	OPM 241F	Carl Zeiss
EKG	Vicom SM	Marquette Hellige
Mouse Ventilator MiniVent	Typ 845	Hugo Sachs Apparatus GmbH
Rektalsonde	-	-
Nachstarschere nach Vannas	8 mm, gerade	AESULAP
Mikrofederschere	120 mm, gebogen	AESULAP
Nagelhautschere	90 mm, gebogen, extrafein	AESULAP
Mikropinzette Uhrmacher	110 mm	AESULAP
Anatomische Pinzette	115 mm, sehr fein	AESULAP
Chirurgische Pinzette	-	AESULAP
Mikro-Nadelhalter	160 mm, gebogen	AESULAP
Wundspreizer	50 mm	AESULAP
Mikroliterspritze	Modell RN	Hamilton
Mikrokanüle	33 Gauge, Modell RN	Hamilton
Mikrokanüle	25 Gauge	BD Microlance
Prolene 8 - 0	Nicht resorbierbar	Ethicon
Safil violett, DS 19	resorbierbar	B. Braun

Tabelle 3: Medikamente

Medikament	Spezifikation/Kat.-Nr.	Firma
Tribromethanol	Avertin	Sigma Aldrich
Bepanthen®-Creme	-	Roche
Isotone Kochsalzlösung (NaCl 0,9 %)	-	B. Braun Melsungen AG
Kalium-Chlorid (99,5%)	-	Merck
Sauerstoff für medizinische Zwecke	-	Messer Griesheim
Stickstoff für medizinische Zwecke	-	Messer Griesheim
Metamizol-Tropfen	-	Ratiopharm®

2.2.3. Infarktgrößenbestimmung

Es wurden vier horizontale Gewebeschnitte (Abb. 7) des kryokonservierten Herzens (Dicke 5 µm) mittels eines Kryo-Mikrotoms angefertigt und auf Objektträger überführt. Zur Infarktgrößenbestimmung erfolgte eine Färbung der Schnitte mit *Sirius Red* (Kollagen; Sigma-Aldrich) und *Fast Green FCF* (Herzmuskelgewebe; Division Chroma, Münster, Germany).

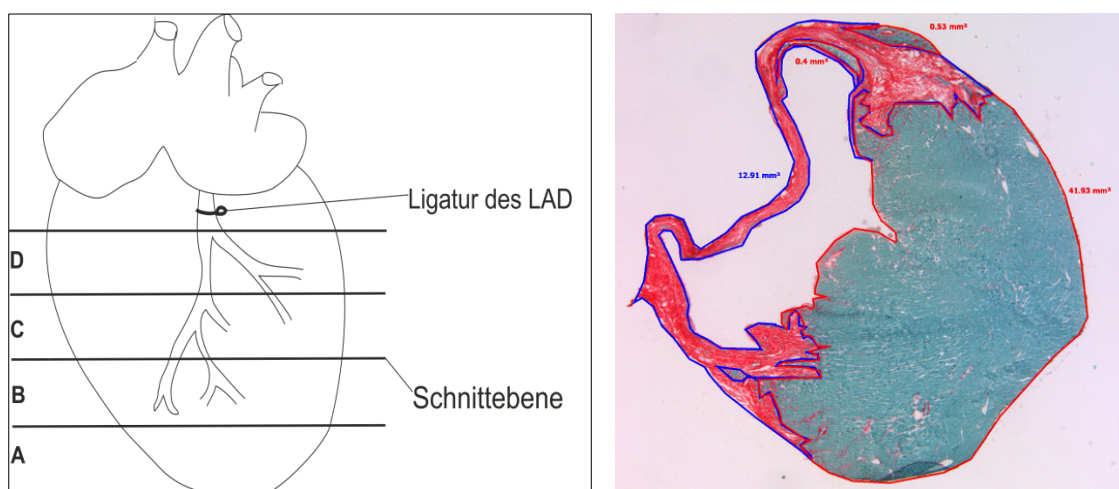


Abb. 7: Darstellung (links) der vier Schnittebenen am kryokonservierten Herz. Grafische Auswertung (rechts) der mit Sirius Red und Fast Green gefärbten Schnitte. Infarktgewebe (rot; blau umrandet), vitales Myokard (grünblau; rot umrandet)

Dafür wurden die Schnitte zunächst in 10 % Formalin für 10 min bei Raumtemperatur fixiert und im Anschluss mit destilliertem Wasser gewaschen. Es erfolgte im ersten Schritt die Färbung mit 0,1 % *Sirius-Red*-Arbeitslösung für drei Minuten und anschließend die Färbung mit 0,1 % *Fast-Green*-Arbeitslösung für 10 Minuten. Beiden Durchgängen folgte ausgiebiges Waschen mit destilliertem Wasser. Die Entwässerung geschah mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe und Überführung in das Intermedium Xylol. Zum Schluss wurden die Schnitte mit Medite Pertex® eingedeckt und mit einem Deckglas verschlossen. Die Schnitte wurden lichtmikroskopisch fotografiert. Die beiden Herzebenen, die der Region mit der größten Infarktausdehnung entsprachen, wurden mit Hilfe einer Software (Axiovision LE Rel. 4.5, Zeiss, Jena, Germany) planimetrisch vermessen. Hierbei erfolgte zunächst die Bestimmung der Infarktausdehnung, welche sich rot darstellt (*Sirius Red*) und dann die Größe des gesunden Myokards, grün (*Fast Green*) dargestellt (Abb. 7). Aus diesen beiden Werten wurde die relative Infarktgröße berechnet.

2.2.3.1. Materialien

Tabelle 4: Färbung mit Siriusred und Fastgreen

Material	Spezifikation/Kat.-Nr.	Firma
Destilliertes Wasser	Aqua dest	Baxter S.A.
Formalin 10%	Formafix 37 % Aqua dest	Grimm Med. Logistik Baxter S.A.
Objektträger	Glasobjektträger	Marienfeld
Xylol	Xylene	J.T. Baker
Ethanol	Ethanol 100%	UKR
Sirius Red	Siriusred F3BA, 09400	Division Chroma
Fast Green	Fastgreen FCF, F 7258	Sigma-Aldrich
Stocklösung „Färbung“ 1%	Pulver Färbung 1g 1% Pikrinsäure, 100ml	UKR
Arbeitslösung „Färbung“ 0,1%	Stocklösung „Färbung“ 1% 10ml 1% Pikrinsäure, 10ml 100% Essigsäure, 50 µl	UKR J.T. Baker
Eindeckmittel	Pertex®, 41-4010-00	Medite

2.2.4. Bestimmung der kapillären Dichte

Zur Ermittlung der kapillären Dichte mittels Immunfluoreszenz wurden je Herz zwei Schnitte mit der größten Infarktausdehnung mit polyklonalen Ziegen-CD31-Antikörper (Santa Cruz) als Primärantikörper gefärbt. Als fluorchromgekoppelter Sekundärantikörper wurde Alexa-Fluor® 468 (Molecular Probes™) eingesetzt.

Nach dem Waschen der Objektträger mit PBS wurden die Schnitte mit Formalin 1 % für 10 min bei Raumtemperatur fixiert. Im Anschluss an einen zweimaligen Waschvorgang mit PBS von fünf und zehn Minuten Dauer erfolgte die Blockade der endogenen Peroxidase. In einem zweiten Schritt mittels Immersion in 2M HCl für 30 min bei 37°C wurde die spätere Färbeintensität durch Demarkierung der Antigene verstärkt. Im Anschluss an einen PBS-Waschvorgang wurden die Schnitte mit 40 µl CD31-Antikörper-Lösung (Zusammensetzung siehe Materialien) bei 4°C über Nacht inkubiert. Schnitte, welche nur mit Verdünnungspuffer inkubierten, dienten als Negativkontrolle. Am nächsten Tag wurde der Sekundärantikörper Alexa-Fluor® 568 hinzugefügt und bei 37°C über drei Stunden belassen. Im dritten Schritt wurden die Schnitte nun mit DAPI gegengefärbt (Raumtemperatur, 15 min). Zuletzt wurden 10 µl Fluorosave-Lösung aufgetropft, die Schnitte mit einem Deckglas bedeckt und die Ränder mit Nagellack versiegelt.

Unter dem Fluoreszenzmikroskop wurde zunächst die Qualität der Färbung beurteilt. In zwei zusammenhängenden Schnitten mit der größten relativen Infarktausdehnung wurden jeweils zwei Bereiche näher untersucht: Zum einen die Grenzzone zwischen Infarkt und vitalem Myokard sowie eine Region mit maximaler Entfernung zum Infarkt (Remote-Zone), welche vom *Remodeling* am wenigsten betroffen war. In diesen Zonen wurden jeweils 5 zufällig ausgewählte ROI's (region of interest) ausgewertet und die Kapillarzahl je High Power Field bestimmt (HPF, 400x Vergrößerung).

2.2.4.1. Materialien

Tabelle 5: CD31 und DAPI

Material	Spezifikation/Kat.-Nr.	Firma
PBS	04-362500	PAA
Paraformaldehyd 1%	-	-
Peroxidase Block Lösung	Peroxidase Block Reagent Buffer	DAKO
Antigen-Retrival-Lösung	HCl, 2M	UKR

Protein Block Lösung	Protein Block Serum-free Reagent		DAKO
CD31-Antikörperlösung	Anti goat CD31 PECAM-1(M 20), sc-1506	2 µl	Santa Cruz
	Antibody Diluent (S0809)	28 µl	DAKO
Alexa-Fluor® 568-Lösung	Alexa-Fluor® 568 anti goat	2 µl	-
	PBS	700 µl	
DAPI-Lösung (1 µg/ml)	DAPI (5 mg/ml in DMF)	2 µl	-
	PBS	10 ml	
Fluoreszenzschutz	Fluorsave Reagent, 345789		Calbiochem

2.3. Gewinnung und Kultivierung humaner mesenchymaler Stammzellen

2.3.1. Gewinnung und Charakterisierung von hMSC

Die humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC) wurden durch die Arbeitsgruppe von Frau Dr. Bieback an der Universität Mannheim im Rahmen des START-MSC-Projektes zur Verfügung gestellt. Wie bereits ausführlich beschrieben [40] wurden die hMSC aus Knochenmark des Femurschaftes beziehungsweise des Beckenkamms (bone marrow; BM-MSC), aus Fettgewebe von Fettabsaugungen (adipose tissue; AT-MSC) und aus Nabelschnurblut (cord blood; CB-MSC) gewonnen. In Passage 3 standen sie für Experimente bereit.

Die verwendeten hMSC wurden im Vorfeld durch o.g. Arbeitsgruppe bezüglich ihres Differenzierungspotentials und ihres Immunphenotyps untersucht. Hierbei zeigten alle drei Gruppen die typischen MSC-Marker CD44, CD73, CD29, CD90, CD105 und CD106. Hämatopoetische Marker, wie CD14, CD34 und CD45, wurden nicht exprimiert. BM- und AT-MSC besaßen die Fähigkeit zur Differenzierung zu Knochen-, Fett- und Knorpelgewebe. CB-MSC fehlte die Fähigkeit zur Fettgewebisdifferenzierung.

Zusätzlich zu diesen Zellen wurden in den *in-vitro*-Experimenten BM-MSC aus dem Sternum von Patienten gewonnen, welche sich einer Herzoperation mit Sternotomie unterzogen. Die weitere Isolation und Charakterisierung der hMSC entspricht dem zuvor beschriebenen Procedere [40].

2.3.2. Kultivierung von hMSC

Die in 20 % DMSO eingefrorenen hMSC wurden im Wärmebad soweit aufgetaut bis nur noch ein kleiner Eiskern erkennbar war. Anschließend wurden sie mit einer Pasteurpipette tröpfchenweise in ein 15-ml-Falcon-Röhrchen mit 10 ml Stammzellmedium MSCGM (LONZA, Basel, Schweiz) überführt. Um das DMSO zu entfernen, wurden die Zellen zentrifugiert und nach Verwerfen des Überstandes in 1 ml MSCGM resuspendiert. Danach erfolgte die Aussaat mit einer Dichte von 3000-5000 Zellen/cm² in Kulturflaschen. Der Mediaustausch erfolgte alle zwei bis drei Tage. Die Passage erfolgte nach Erreichen einer Konfluenz von 80-90 %.

2.3.3. Magnetseparation (MACS®)

Die Magnetseparation ist ein Zellseparationsverfahren (MACS®, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) bei welchem gegen spezifische Oberflächenantigene gerichtete Antikörper mit superparamagnetischen *Microbeads* gekoppelt werden. Da die *MicroBeads* biologisch abbaubar sind, verändern sie weder Struktur, Funktion noch Aktivität der separierten Zelle. Die mit den entsprechenden Antikörpern inkubierten Zellen passieren als Einzelzellsuspension eine Säule mit MACS®-Matrix in einem starken Magnetfeld. Während nicht antikörperbesetzte Zellen die Säule ungehindert durchlaufen, werden die markierten Zellen im Magnetfeld zurückgehalten. Bei der positiven Selektion werden die zurückgehaltenen Zellen anschließend aus der Säule ausgewaschen und für weitere Experimente verwendet (Abb. 8)[106].

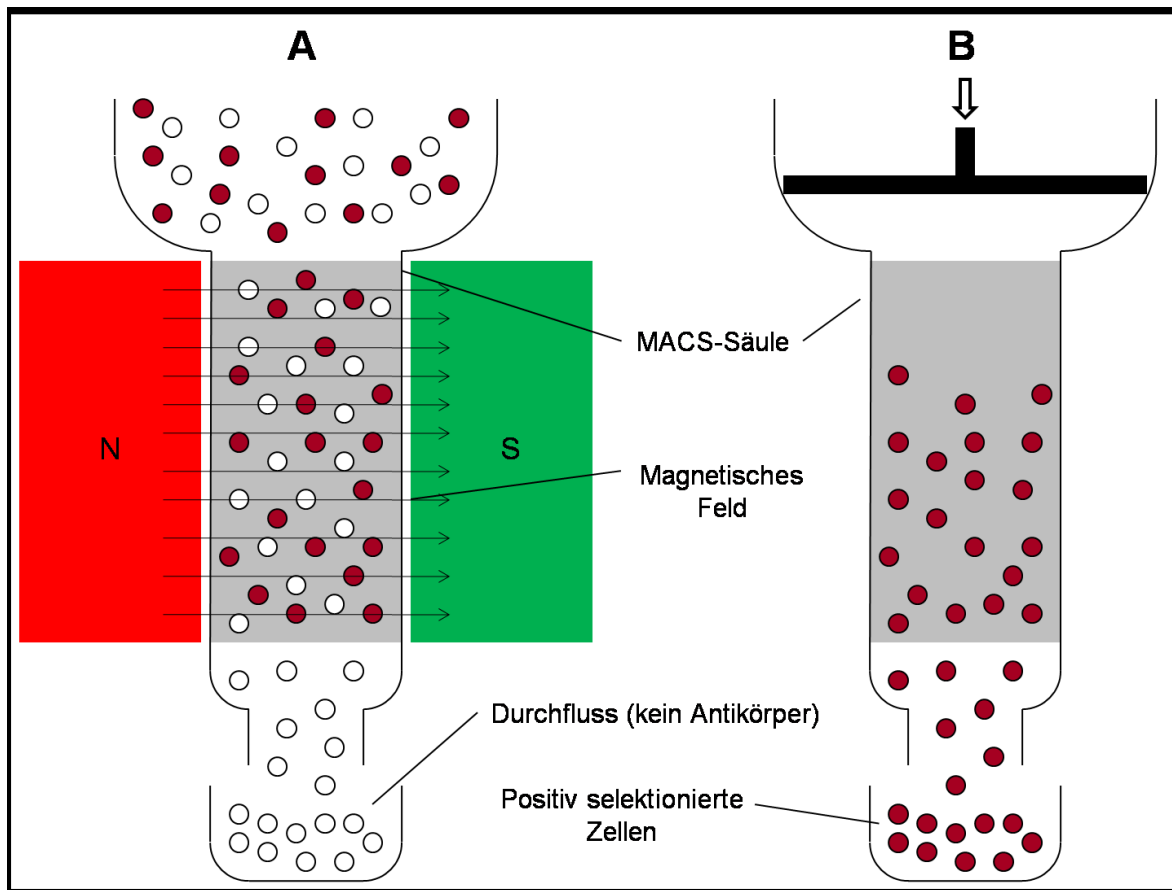


Abb. 8: **Prinzip der Magnetseparation:** (A) Eine Zellsuspension passiert die MACS[®]-Säule in einem starken Magnetfeld. Mit *MicroBeads* markierte Zellen werden zurückgehalten. Rote Zellen = mit *MicroBeads* markiert, weiße Zellen = ohne *MicroBeads*. (B) Die zuvor zurückgehaltenen Zellen werden aus der Säule ausgewaschen.

Das Ziel des durchgeführten Experiments war, hMSC mit Hilfe von CD105 *MicroBeads* positiv zu selektionieren. Die kultivierten hMSC wurden bei ca. 90 % Konfluenz trypsiniert und als Einzelzellsuspension in ein 2 ml Eppendorf-Gefäß mit MACS-Puffer überführt. Nach der Zellzählung in einer Neubauerzählkammer wurden die Zellen mit 400 × g bei 4 °C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert, das Zellpellet in 160 µl MACS-Puffer pro 500.000 Zellen resuspendiert und 40 µl CD105 *MicroBeads* pro 500.000 Zellen hinzugefügt. Danach erfolgte die Inkubation der Zellen für 30 min bei 4 °C auf einem Schüttler. Zur Unterbrechung der Inkubation wurde das Röhrchen mit MACS-Puffer aufgefüllt, bei 400 × g, 4 °C für 10 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und in 500 µl MACS[®]-Puffer pro 1 Mio. Zellen aufgenommen.

Die Zellsuspension wurde nun auf eine MACS[®]-MS-Säule gegeben. Ein Präseparationsfilter verhinderte, dass Zellklumpen die Säule verstopften. Nach

dreimaligem Spülen der Säule mit je 500 µl MACS®-Puffer wurde die Säule aus dem Magneten entfernt, 1 ml MACS®-Puffer auf die Säule gegeben und die in der Säule befindlichen Zellen eluiert. Die so gewonnene CD105-Positivselektion wurde erneut auf eine unbenutzte Säule gegeben und der Vorgang wiederholt, um eine höhere Reinheit zu erreichen.

Die so selektierten Zellen wurden in einer Neubauerzählkammer gezählt. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie erfolgte die Überprüfung der Zellen auf ihre Reinheit. Dazu wurde die Positivfraktion mit der unselektierten und der depletierten Fraktion, verglichen (vgl. Kapitel Durchflusszytometrie).

2.3.4. Materialien

Tabelle 5: Materialien für die Kultivierung

Materialbezeichnung	Spezifikation/Kat.Nr.	Firma
MSCGM BulletKit®	PT3001	LONZA
Trypsin/EDTA 10%		PAA
PBS, pH 7,2	04-362500	PAN
Recovery Cell Culture Freezing Medium	12648-010	GIBCO

Tabelle 6: Materialien für die Magnetseparation

Materialbezeichnung	Spezifikation/Kat.Nr.	Firma
CD105 MicroBeads	130-051-201	Miltenyi Biotec
MACS®-Puffer	PBS, pH 7,2	PAN
	0,5% Bovine Serum Albumin (A7906-566)	Sigma Aldrich
	2 mM EDTA (E-7889)	Sigma Aldrich
MACS®-MultiStand	130-042-303	Miltenyi Biotec
MS Columns	130-042-201	Miltenyi Biotec
OctoMACS™ Separation Unit	130-042-109	Miltenyi Biotec
Pre-Separation Filters	130-041-407	Miltenyi Biotec

2.4. Lipofektion mit *Antisense*-ODN

2.4.1. *Antisense*-Oligodesoxynukleotide

Ziel des Experimentes war, die Expression von CD105 durch Blockade der mRNA zu unterdrücken. Sogenannte *Antisense*-Oligodesoxynukleotide (ODN), die komplementär zum Startcodon des Zielgens sind, werden via Transfektion in die Zelle eingeschleust. Im Zytoplasma hybridisieren sie mit der entsprechenden mRNA und führen je nach chemischer Struktur zu einer Degradation der mRNA durch RNase-H oder blockieren die Translation durch sterische Effekte (Abb. 9). ODN sind Einzelstrang-DNA von kurzer Länge (13-25 Nukleotide). Das Rückgrat beruht auf einer Phosphodiesterbindung, die chemisch modifiziert werden kann. Die am weitesten verbreitete Modifikation ist die Substitution eines nicht brückenbildenden Sauerstoffatoms durch ein Schwefelatom. Man bezeichnet das als Phosphorothioat-ODN. Diese und die Phosphodiester-ODN führen intrazellulär zu einem RNase-H-bedingten Abbau des RNA-Stranges des RNA/DNA-Komplexes. Andere Modifikationen, wie Methylphosphonate-ODN, PNA-(*peptide nucleic acids*) ODN oder Morpholino-ODN bewirken keine Aktivierung der RNase H.

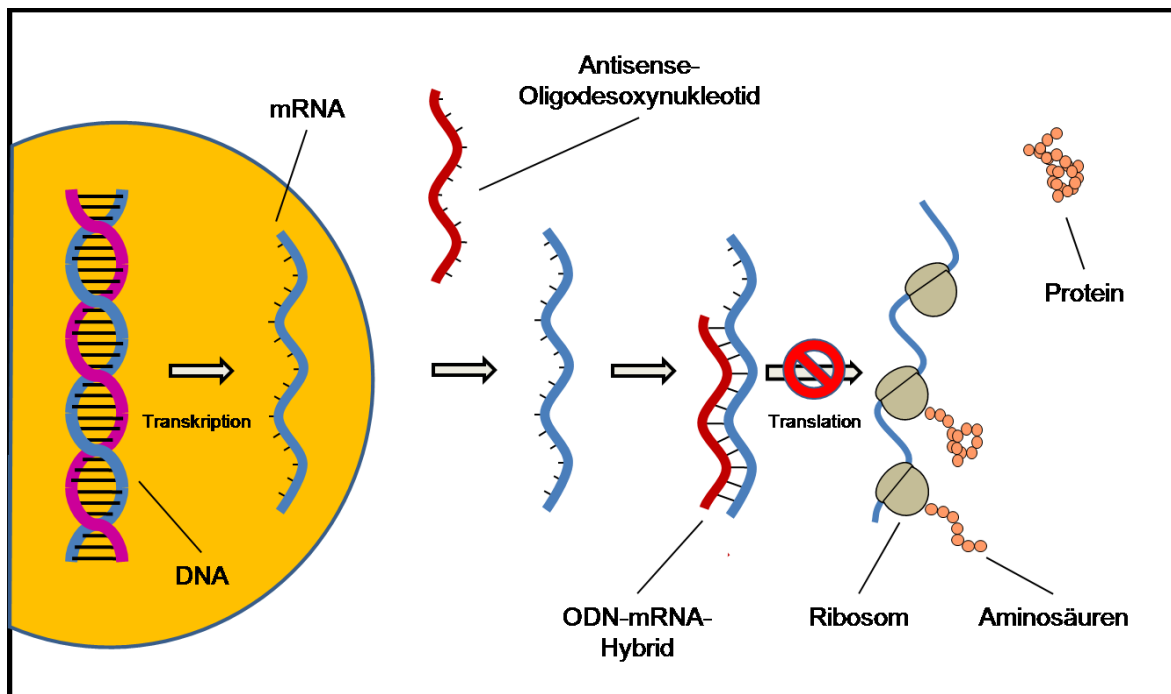


Abb. 9: Antisense-ODN: Die Antisense-Oligodesoxynukleotide binden im Zytoplasma an das Startcodon der mRNA und verhindern somit die Translation.

Die im Experiment benutzten ODN waren Phosphorothiat-ODN mit der *Antisense*-Sequenz 5'-ATGCTGTCCACGTGGG-3'. Als Kontrolle fungierte ein sogenanntes

Scrambled-ODN mit den gleichen Basen in einer „verrührten“ Reihenfolge (5'-ACTCGTGCTACGGTGG-3'), die mit keinem bekannten menschlichen Gen übereinstimmt. Die ODN wurden in einem automatischen DNA-Synthesizer (EUROGENTEC, Liège, Belgien) hergestellt und durch High-Performance-Liquid-Chromatographie aufgereinigt.

2.4.2. Lipofektion

Unter Transfektion versteht man das Einbringen von fremder DNA in eine Zelle. Eine Methode der Transfektion ist die Lipofektion. Hierbei wird die DNA durch kationische Liposomen umschlossen. Die Liposomen fusionieren mit der Zellwand der Zielzellen und die DNA wird ins Zytoplasma freigesetzt. Bei dem verwendeten Lipofektionsreagens handelt es sich um Lipofectamine 2000.

Vor der Transfektion wurden die Zellen passagiert, gezählt und in 6-Well- oder 24-Well-Platten ausgesät. Erreichten die Zellen nach ein bis drei Tagen eine Konfluenz von 80 %, wurde transfiziert. Vor Transfektion wurden die 2 ml (24-well: 500 µl) MSCGM pro Well durch frisches Medium ersetzt.

8,1 µl (1,62 µl) ODN und 10 µl (2 µl) Lipofectamine 2000 wurden jeweils mit MSCBM (serumfrei) auf 250 µl (50 µl) verdünnt. Nach dem Zusammenführen der ODN- und der Lipofectamine-2000-Lösung wurde für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert, sodass sich die ODN-Liposomenkomplexe formen konnten. Der Ansatz wurde vorsichtig resuspendiert und auf die hMSC-Zellkultur gegeben. Die Kulturen wurden bei 5 % CO₂ und 37 °C für 24 Stunden inkubiert. Danach wurde das Medium gewechselt und die transfizierten Zellen standen für weiterführende Experimente zur Verfügung.

2.4.3. Materialien

Tabelle 7: Materialien für Lipofektion mit ODN

Materialbezeichnung	Spezifikation/Kat.Nr.	Firma
<i>Antisense</i> - Desoxyoligonukleotid	5'-ATGCTGTCCACGTGGG-3'	Eurogentec
<i>Scrambled</i> - Desoxyoligonukleotid	5'-ACTCGTGCTACGGTGG-3'	Eurogentec
Lipofectamine TM 2000	11668-019 (1,5 ml)	Invitrogen
MSCBM	-	Lonza

2.5. Apoptosebestimmung *in vitro*

Es wurde in zwei Teilexperimenten die Apoptoserate der hMSC unter Hypoxiebedingungen gemessen. Im ersten Teil wurde wie bei den *In-vivo*-Versuchen CD105-tragende CB-MSC mittels MACS angereichert und mit einer nicht angereicherten Population verglichen. Im zweiten Teil wurden AT-MSC aus humanem Fettgewebe verwendet, von denen eine Gruppe durch Antisense-ODN weniger CD105 exprimierte. Bei einer Konfluenz von 70-80% wurde MSCGM gegen MSCBM (serumfrei) ausgetauscht und für 36 Stunden unter hypoxischen Bedingungen kultiviert.

2.5.1. Hypoxiekammer

Zur Apoptoseinduktion wurden die Zellen nach Aussäen in 24-Well-Platten in serumfreiem Medium in einer Hypoxiekammer platziert. Durch diese wurde für 30 min ein Stickstoff-95 %/Kohlendioxid-5 %-Gasgemisch geleitet. Nach Verschluss beider Ventile wurde die Kammer für 36 Stunden im Inkubator bei 37 °C bebrütet.

2.5.2. Tunelfärbung

Apoptose ist ein Prozess, bei dem eine Zelle durch ein komplexes Programm in den Zelltod übergeht. Dieser, auch programmierter Zelltod genannte Vorgang, ist durch verschiedene mikroskopische, biochemische als auch molekularbiologische Zeichen charakterisiert. Dazu zählen u.A. das Schrumpfen der Zelle, die Kernpyknose, die Chromatinkondensation und Abschnürungen der Zellmembran mit Vesikelbildung [107]. Auf DNA-Ebene kommt es durch Endonukleasen zu einer Fragmentation der DNA in Teilstücke zwischen 180-200 bp [108].

Der TUNEL(Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling)-Assay misst diese DNA-Fragmente, indem durch das rekombinante Enzym terminale Desoxynukleotidyltransferase (rTdT) wird Fluorescein-12-dUTP am 3'-OH-Ende der DNA angefügt [109]. Mittels direkter Fluoreszenzmikroskopie können die apoptischen Zellen erfasst werden.

Die für die TUNEL-Färbung vorgesehen hMSC wurden in 24-Well-Platten auf runden Deckgläschen ausgesät. Nach vorheriger Transfektion und Inkubation in der Hypoxiekammer (vgl. 2.4. und 2.5.1.) wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit Formalin 4 % fixiert. Nach erneutem zweimaligem Waschen wurden die Zellen mit 0,1 % Triton-X100 für 15 min permeabilisiert, gewaschen und mit je 100 µl Equilibrierungspuffer

stabilisiert. Anschließend wurden 25 µl TdT-Reaktionsmix, bestehend aus 22 µl Equilibrierungspuffer, 2,5 µl Nukleotidmix und 0,5 µl rTdT-Enzym auf die Zellen gegeben und bei 37 °C in einer feuchten Kammer für 60 min inkubiert. Ab diesem Schritt muss die Lichtexposition so gering wie möglich gehalten werden. Die Reaktion wird mit Standard Saline Citrate (SSC) abgestoppt. Die Zellen werden mehrmals gewaschen, bevor mit Propidiumjodid (1 µg/ml in PBS) gefärbt wird. Nach Waschen mit destilliertem Wasser, Einbetten in Fluorsave® (Calbiochem, Cat#: 345789) und Abdecken mit Deckgläschen (18 × 18 mm) können die Proben unter einem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet werden.

Es wurden je Probe 20 HPF ausgezählt. Zuerst wurden die TUNEL-positiven grün fluoreszierenden apoptotischen Zellen (Wellenlängenbereich 520 nm) gezählt und anschließend durch Zählung der Propidiumjodid-positiven rot fluoreszierenden Zellen (Wellenlängenbereich >620nm) die Gesamtzellzahl bestimmt.

Tabelle 8: Materialien für Apoptosebestimmung

Materialbezeichnung	Spezifikation/Kat.Nr.	Firma
Modular Incubator Chamber	MIC-101	Billups-Rosenberg
DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System	G3250	Promega
Fluorsave	345789	Calbiochem
Stickstoff für medizinische Zwecke	-	Messner Griesheim
Kohlendioxid für medizinische Zwecke	-	Messner Griesheim

2.6. Durchflusszytometrie zur Bestimmung der CD105-Expression

2.6.1. Funktionsweise eines Durchflusszytometers

Bei der Durchflusszytometrie können in Suspension vorliegende Partikel oder Zellen mit Hilfe eines Laserstrahles analysiert werden. Die Suspension wird durch eine Kapillare geleitet, wobei der Flüssigkeitsstrom durch hydrodynamische Fokussierung so dünn ist, dass Zelle für Zelle hindurchtritt. Trifft der Laserstrahl auf eine Zelle, wird das Licht einerseits gestreut und abgelenkt (Abb. 10), andererseits kann Licht durch Fluoreszenz emittiert werden, sofern entsprechende Fluoreszenzfarbstoffe an die Zelle gebunden sind. So ist eine Analyse von bis zu 100.000 Zellen in der Minute möglich.

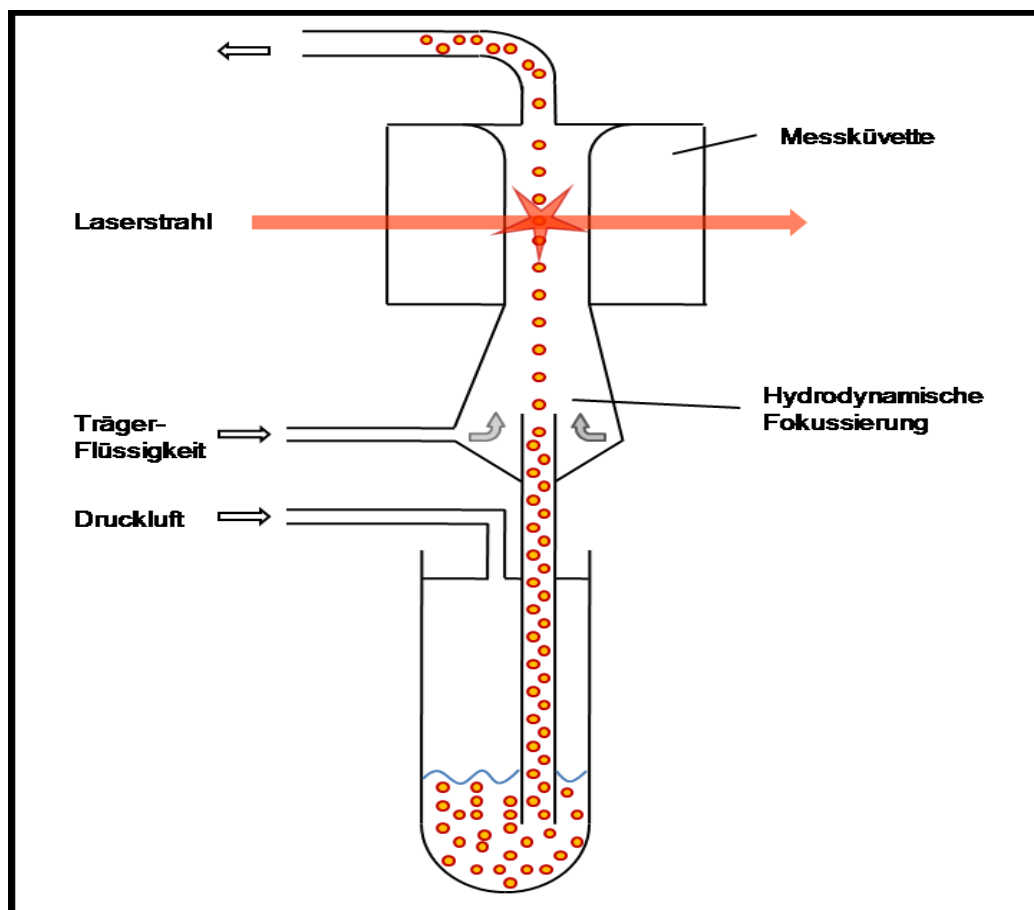


Abb. 10: Prinzip der Durchflusszytometrie: Die Zellen einer Einzelzellsuspension werden durch eine Messküvette geleitet. Durch hydrodynamische Fokussierung werden diese wie an einer Perlenschnur aufgereiht und passieren mehrere Laserstrahlen. (bearbeitet nach Betriebsanleitung FACSScan®)

Das Streulicht (*Scatter*), welches durch die Zelle hindurchtritt, wird als Vorwärtstreulicht (*Forward Scatter*, FSC) bezeichnet und ist ein Maß für die Größe der Zelle. Das Seitwärtstreulicht (*Side Scatter*, SSC) hingegen erlaubt Aussagen über die Granularität der Zelle.

2.6.2. Bestimmung der CD105-Expression

Humane MSC wurden ein bis drei Tage vorher in 6-Well-Platten ausgesät. Wenn die Konfluenz bei etwa 80 % lag, wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit Accutase[®] von der Oberfläche gelöst. Nach Zentrifugation und Zellzahlbestimmung wurden die Zellen in FACS-Puffer aufgenommen, erneut zentrifugiert und mit ProteinBlock[®] (DAKO, Deutschland) behandelt. Nach wiederholtem Waschen und Zentrifugation wurde das Zellpellet in Anti-CD105-PE (ABCAM) oder -APC (Serotec) sowie in FACS-Puffer aufgenommen (Verhältnis 1:10). Die Inkubation erfolgte bei 4 °C und Dunkelheit für 30 min. Danach wurde dreimal gewaschen und zentrifugiert. Die Zellen wurden in FACS-Puffer aufgenommen und noch am gleichen Tag analysiert. Die durchflusszytometrische Messung wurde am LSR II (BD Biosystems) vorgenommen und mit der FACSDiva-Software (BD) analysiert.

2.7. Tube Forming Assay

Zur Durchführung dieses Assays wurde Wachstumsfaktor-reduziertes BD Matrigel[™] (BD Bioware, Bedford, MA, USA) verwendet. Matrigel wird aus Engelbreth-Holm-Swarm-Maassarkomzellen extrahiert und besteht hauptsächlich aus Laminin, Collagen IV, Heparansulfat-Proteoglykane und Entactin [110]. Damit entspricht es weitgehend der extrazellulären Matrix. Außerdem enthält es verschiedene Wachstumsfaktoren wie TGF- β -1, Epidermale growth factor, Insuline like growth factor und andere [111]. In den durchgeführten Experimenten wurde wachstumsfaktorreduziertes Matrigel verwendet.

Es wurden drei Gruppen verglichen:

- hMSC, behandelt mit CD105-Antisense-ODN, (CD105⁻, n=3)
- hMSC, behandelt mit CD105-Scrambled-ODN (CD105⁺, n=3)
- eine Kontroll-Gruppe (n=3).

Humane mesenchymale Stammzellen in Zellkultur wurden trypsinisiert, zentrifugiert und gezählt mit anschließender Aufnahme in EGM-2 (*Endothelial growth medium*, LONZA, Basel, Schweiz). Anschließend wurden ca. 70.000 Zellen in 200 μ l Matrigel suspendiert und jeweils gleichmäßig in den Kammern eines 4-Well-Objekträgers verteilt (4-Well-

chamber slides, Lab-Tek, Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Dänemark). Anschließend wurde für 30 min im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach Verfestigung des Gels wurden 200 µl EGM-2 pro Kammer appliziert und die Zellen weiter inkubiert. Das Medium wurde täglich gewechselt. Pro Kammer wurden zwölf Photos am Tag angefertigt, je sechs auf Objektträgerebene und in der Mitte des Gels. Insgesamt wurde über sieben Tage beobachtet. Die Vermessung der Netzwerklänge und Zellzählung erfolgte mit Hilfe der ImageJ-Software.

2.8. Echtzeit-Azidifikation und Impedanz von hMSC *in vitro*

Die Silikonchiptechnologie erlaubt es, das Verhalten von Zellen *in vitro* zu untersuchen. Durch Einsatz des *metabolic chip* SC 1000 in Verbindung mit dem Online-Analyse System Bionas® 2500 (Bionas®, Rostock, Deutschland) lassen sich pH-Wertveränderungen und der Sauerstoffverbrauch in der Umgebung der Zellen in Echtzeit bestimmen. Außerdem lässt sich mit Hilfe einer Impedanz die Adhärenz der Zellen charakterisieren. Diese Methode ist nicht invasiv und benötigt keine Zusätze an Antikörpern oder anderen Reagentien, die das Verhalten der Zellen beeinflussen könnten.

hMSC wurden im Duplikat direkt auf dem Chip ausgesät, sodass sie innerhalb von 24 Stunden eine Konfluenz von circa 80% erreichten. Das verwendete Medium entsprach einem pufferfreien Medium (bikarbonatfrei, 1 mM HEPES, 0,1% FCS, 10.000 U Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin) mit einem pH-Wert von 7,4 und einer Osmolarität von 290 mosm/kg. Dieses wurde periodisch erneuert. Eine Zykluslänge betrug 8 min (4 min Pumpen, 4 min Stop) und blieb über die gesamte Dauer des Versuchs von 24 Stunden konstant. In der Stopphase erfolgte die Messung. Abbauprodukte wie Lactat oder CO₂ sowie der Sauerstoffverbrauch der Zellen führen zu einer Veränderung des Sauerstoffgehaltes und einer Ansäuerung des Mediums. Die Ansäuerung wurde mit Hilfe von SFET (*Sensitive Field Effect Transistors*) gemessen. Die Angabe der Azidifikationsrate erfolgt als Verhältnis gegenüber der Basalrate in Prozent. Dank des IDES-Bauelements (*Interdigitated electrode structures*) lässt sich die Zellimpedanz bestimmen. Diese ist abhängig von den Zell-Zell-Kontakten, der durch die Zellen bedeckten Elektrodenoberfläche, dem Abstand der Zellmembran von der Elektrode, den isolierenden Eigenschaften der Zellen und der Leitfähigkeit des verwendeten Mediums [112]. Die beiden letztgenannten Punkte bleiben während eines Experiments mit der gleichen Zellgruppe konstant, sodass eine Änderung der Impedanz eine Aussage über die

Konfluenz, die Adhäsion und die Interzellkontakte erlaubt. Für Versuche in Hypoxie wurden die Zellen in einer Stickstoffumgebung untersucht. Am Ende wurden die Zellen mit 0,2% Triton X-100 abgetötet.

2.9. Software

In Abhängigkeit vom verwendeten Mikroskop beziehungsweise Gerät war es erforderlich, unterschiedliche Software zur graphischen Auswertung zu nutzen:

- Axiovision LE Rel. 4.5, Zeiss, Jena: Infarktgrößenvermessung
- Leica Application Suite: Kapilläre Dichte, TUNEL
- Image J (National Institut of Health, USA): Tubeforming Assay
- FACS-Diva (BD Biosystems): Durchflusszytometrie.

2.10. Statistische Auswertung

Für die statistische Analyse wurde SigmaPlot 10.0 (Chicago, USA) verwendet. Die Ergebnisse erscheinen jeweils als Mittelwert \pm Standardfehler. Bei der Analyse von mehreren Gruppen wurde die Einweg-Varianzanalyse (ANOVA) ausgeführt, gefolgt von einem entsprechenden post hoc Vergleichstest (Holm-Sidak, multiple Dunn-Test, Turkey test). Bei der Analyse von zwei Gruppen, fand der Student's t-test Anwendung. P-Werte kleiner 0,05 wurden als statistisch signifikant gewertet.

2.11. Material im Allgemeinen

Tabelle 9: Allgemeine Materialien

Materialbezeichnung	Spezifikation/Kat.Nr.	Firma
Zentrifuge groß	Multifuge 1 S-R	Heraeus
Zentrifuge klein	Centrifuge 5417R	Eppendorf
Tischzentrifuge	Galaxy Mini Centrifuge	VWR International
Laminar Flow Station	Safeflow 1.2.	BIO AIR INSTRUMENTS
Brutschrank	9040-0026	Binder

Material und Methoden

Lichtmikroskop	DM LB	Leica
Digitalcamera	DC 200	Leica
Kryo-Mikrotom	CM1850	Leica
Confocal Mikroskop	SP2 Confocal Microscope	Leica
Micropipette	Verschieden Größen	Eppendorf
Multipipette plus	-	Eppendorf
Pasteurpipette	-	Roth
Tisch-Shaker	Vortex-Genie 2, G-560E	Scientific Industries
Platten-Shaker	3015	GFL
Kühlschrank	4°C	GRAM
Tiefkühlschrank	-20°C Premium Nofrost	Liebherr
Tiefkühlschrank	-80°C Hera freeze	Heraeus
Flüssigstickstoffcontainer	Chronos 0092	Messer
Falcon	Cellstar 15 ml, 188-26 Cellstar 50 ml, 227-261	Greiner-one
6-/24-Well Platte	Cellstar, Cat.# 657160/662160	Greiner -one

3. Ergebnisse

3.1. Infarktgröße

Die Ligation der LAD resultierte in einem Myokardinfarkt der linksventrikulären Vorderwand. Die typischen histologischen Befunde, wie Ausdünnung der linken Herzwand und Kollagenablagerung (Rot, *Sirius Red*), sind sechs Wochen nach Infarkt deutlich sichtbar (Abb. 11). Gesundes Herzgewebe ist in den Schnitten grün dargestellt (*Fast Green*). Die Infarktgröße ist als prozentualer Anteil der Gesamtherzmuskelfläche abgebildet.

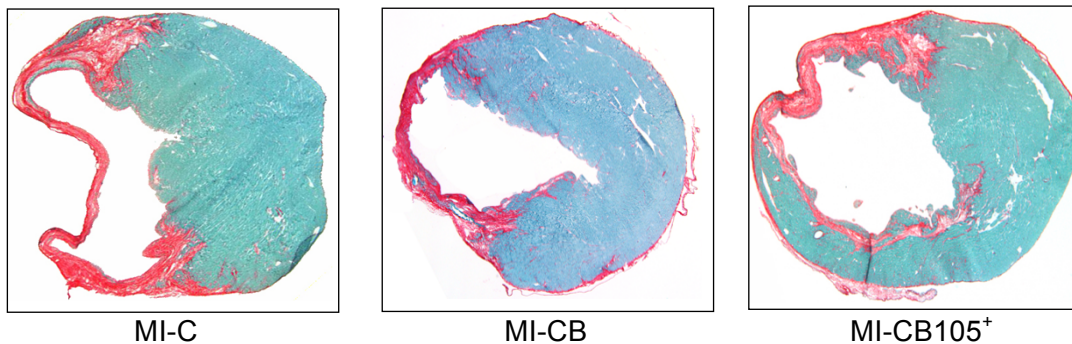


Abb. 11: Korrespondierende Schnitte der Herzen 6 Wochen nach Myokardinfarkt ohne (MI-C) oder mit Injektion von hMSC (MI-CB und MI-CB105). Rot gefärbt sind Gebiete mit Kollagenablagerung respektive Infarkt. Grün-türkis entspricht gesundem Herzmuskel.

Ziel der Infarktgrößenbestimmung war, festzustellen, ob injizierte CD105-angereicherte hMSC aus Nabelschnurblut (MI-CB105⁺) Einfluss auf die Größe des Infarktareals haben. Verglichen wurde diese Gruppe mit einer Gruppe, die mit nicht angereicherten hMSC aus Nabelschnurblut (MI-CB) behandelt wurde, und einer Kontrollgruppe ohne Zellinjektion (MI-C). Wie in Abbildung 12 gezeigt, ist das Infarktareal bei Injektion von CD105-angereicherten hMSC signifikant kleiner gegenüber der Kontrollgruppe (MI-CB105⁺ $19,62 \pm 1,56$ % vs. MI-C $25,48 \pm 2,63$ %, $p < 0,05$). Nicht angereicherte hMSC bewirken eine tendenzielle, aber nicht signifikante, Verringerung der Infarktgröße.

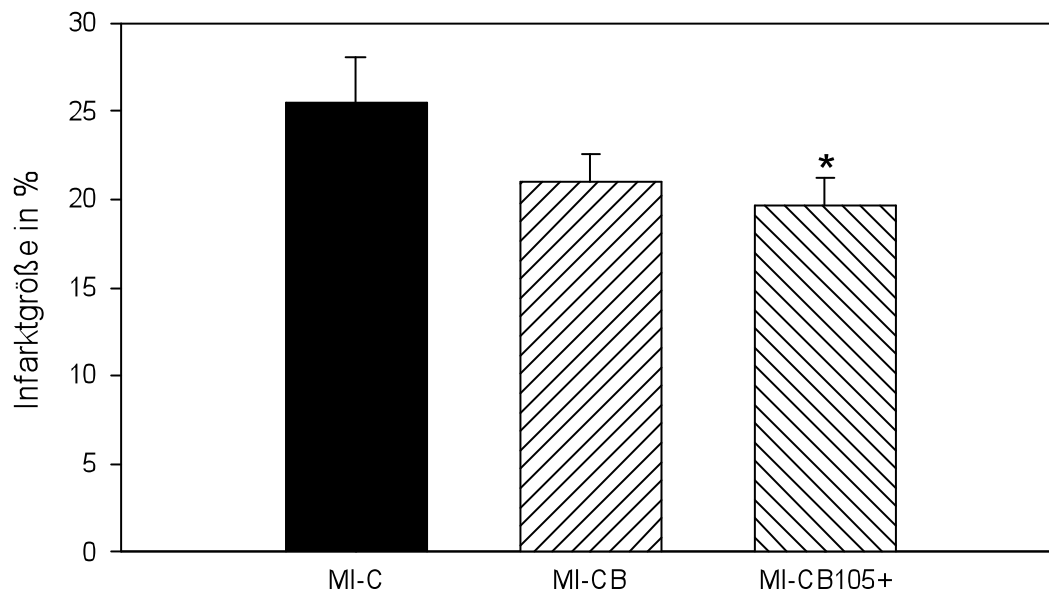


Abb. 12: Die Infarktgröße ist als prozentualer Anteil an der Herzmuskelschnittfläche dargestellt. Mit CD105-angereicherten hMSC aus Nabelschnurblut (MI-CB105⁺) zeigen eine signifikante Reduktion des Infarktareals gegenüber der Kontrollgruppe (MI-C). Nicht angereicherte Nabelschnurblut-hMSC bewirken keinen signifikanten Effekt. Mittelwert \pm Standardfehler, * $p < 0,05$ vs. MI-C, $n=7$

3.2. Kapilläre Dichte

Die kapilläre Dichte in der Grenzzone im Infarktareal wurde bestimmt, um zu ermitteln, ob CD105 angereicherte MSC einen positiven Effekt auf die Anzahl der Kapillaren in unmittelbarer Nachbarschaft des Infarktes haben. Weiterhin wurde die Kapillarzahl in der *Remote*-Zone gemessen. In der Grenzzone ist die kapilläre Dichte der MI-CB105⁺-Gruppe signifikant größer als in den beiden anderen Gruppen (Abb. 13 und 14). Zwischen MI-C und MI-CB besteht kein statistisch greifbarer Unterschied. Bei der Betrachtung der *Remote*-Zone findet sich ein ähnliches Bild. Die MI-CB105⁺-Gruppe hat eine signifikant höhere kapilläre Dichte gegenüber den beiden anderen Versuchsgruppen, die sich nicht messbar voneinander unterscheiden.

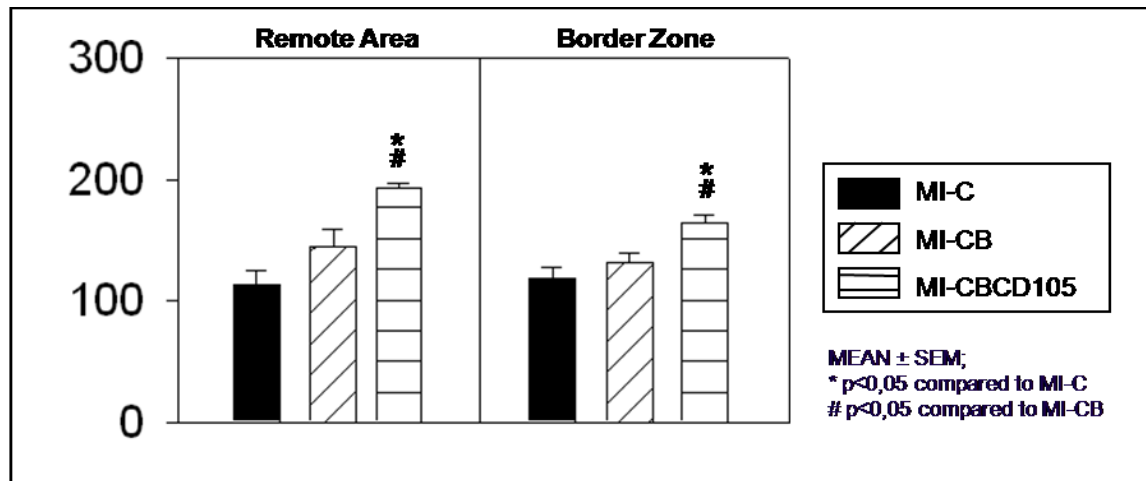


Abb. 13: Kapilläre Dichte in Kapillaren/HPF. MI-CB105⁺ zeigt in der Grenz- und Vergleichszone eine signifikant höhere kapilläre Dichte als MI-C und MI-CB. * $p < 0,05$ vs MI-C, # $p < 0,05$ vs MI-CB, $n=5$

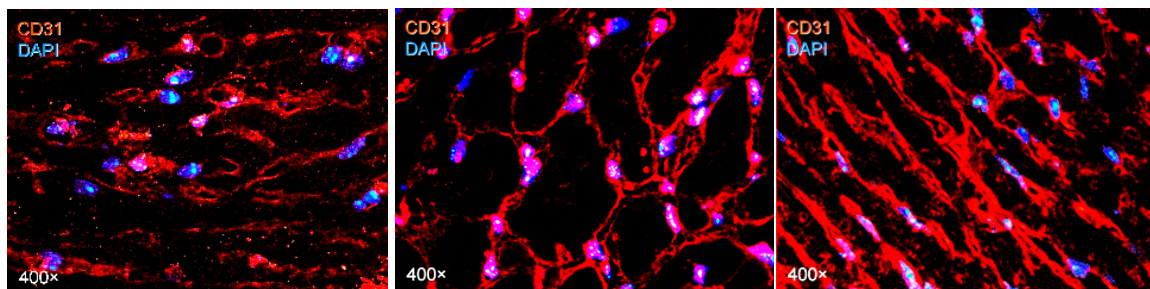


Abb. 14: Repräsentative Bilder der CD31-Färbung aus der Grenzzone in Höhe der Ebene C. Links: Kontrollgruppe, Mitte: MI-CB, Rechts: MI-CBCD105⁺, Vergrößerung 400×

3.3. Echtzeitazidifikation und Zelladhäsion unter Hypoxie

Zur Echtzeitevaluation des Zellenergiestoffwechsels unter hypoxischen Bedingungen wurden hMSC auf Chips ausgesät, welche sowohl die Ansäuerung als auch die Zelladhäsion Zellen messen können. Da es in einem ischämischen Infarktareal zu einem ausgedehnten Zelluntergang kommt, sobald der pH-Wert unter 6,5 sinkt, ist insbesondere die Ansäuerung der Zellumgebung von essentieller Bedeutung. Ziel der Untersuchung war es, herauszufinden, ob sich CD105-angereicherte Zellen unter Hypoxie bezüglich des pH-Wertes anders verhalten als normale CB-hMSC.

In Abb. 15 sind die Ergebnisse des Versuches unter Hypoxie dargestellt. Die Angabe der Azidifikationsrate erfolgt in Prozent relativ zur Basalrate der Zellen unter Normoxie (dargestellt als gepunktete Linie). Wie ersichtlich ist, zeigen normale hMSC eine deutlich

höhere Azidifikationsrate als vergleichbare angereicherte hMSC. Dieser signifikante Unterschied (* $p < 0,05$ CB gegenüber CB105 von 2 h bis 24 h) bleibt über den gesamten Versuchsverlauf erhalten. Die maximale Azidifikationsrate wird bei 6 h mit 186 ± 29 % erreicht. Nach 24 h war diese bis auf 138 ± 11 % abgesunken. Angereicherte hMSC hingegen zeigen keine gesteigerte Azidifikationsrate unter hypoxischen Bedingungen. Diese liegt entweder im Bereich der Basalrate oder sogar darunter.

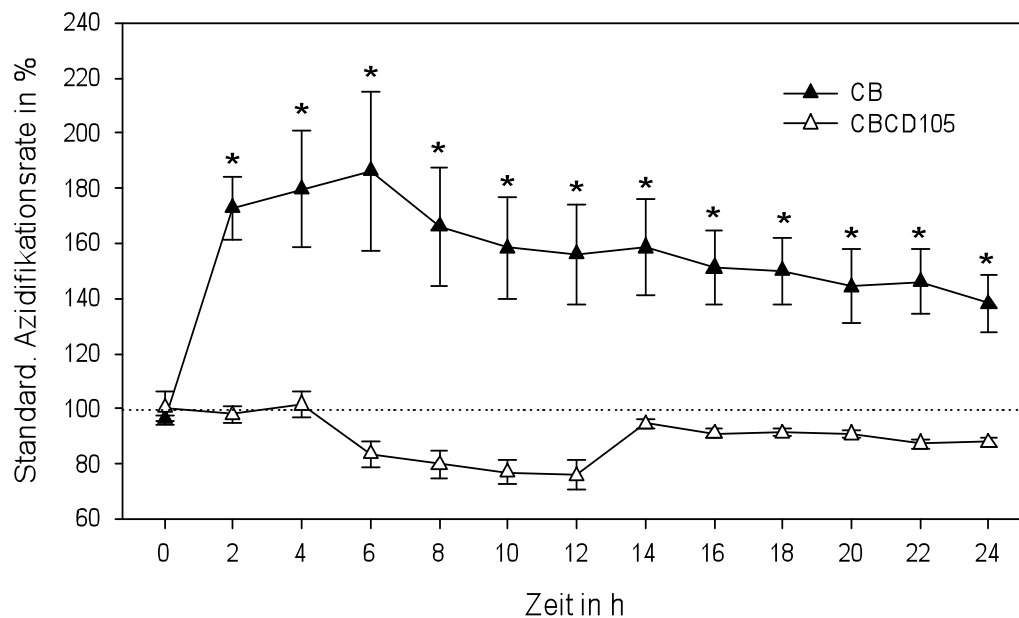


Abb. 15: Azidifikationsrate von CB-hMSC und CD105-angereicherten CB-hMSC (CB105) unter 24 h Hypoxie. CB-hMSC zeigen eine signifikant höhere Azidifikationsrate zwischen 2 h und 24 h gegenüber CD105 angereicherten CB-hMSC (* $p < 0,05$).

Die Zellimpedanz ist ein Maß für die Zelladhäsion. Je höher die Impedanz, desto mehr Zellen als auch Zell-Zell-Kontakte sind vorhanden. In den durchgeführten Versuchen ist die Impedanz relativ zur Impedanz unter Normoxie dargestellt (Abb. 16). Es ist zu beobachten, dass die Impedanz der CD105⁺-CBMSC mit Beginn der Hypoxie abnimmt und sich über die Versuchsdauer von 24 h auf einem Niveau zwischen 82 ± 4 % und 91 ± 6 % bewegt. Demgegenüber steigt die Impedanz der CBMSC kontinuierlich bis auf ein Niveau von 112 ± 6 % an. Die Unterschiede zwischen beiden Gruppen sind bis auf die Messungen bei null und vier Stunden signifikant.

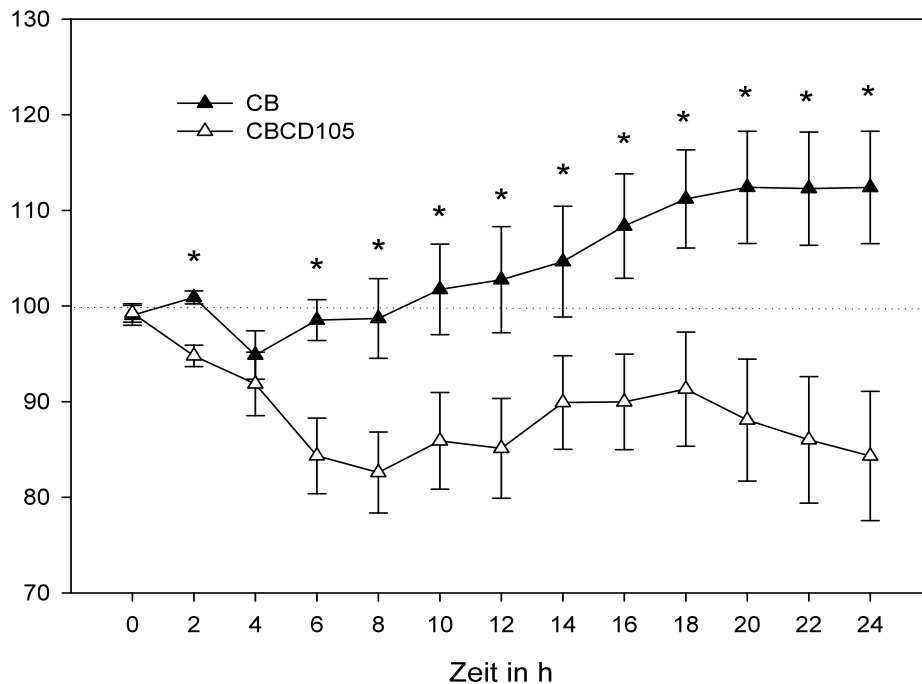


Abb. 16: Impedanz von CB-hMSC und CD105-angereicherten CB-hMSC (CBCD 105) unter 24 h Hypoxie. CB-hMSC zeigen eine signifikant höhere Impedanz/Zelladäsion zwischen 2 h und 24 h gegenüber CD105 angereicherten CB-hMSC (* $p < 0,05$).

3.4. Apoptose *in vitro*

Die Apoptose nach 36 h Hypoxie wurde mit Hilfe eines TUNEL-Assays bestimmt. In zwei separaten Experimenten wurden zunächst hMSC aus Nabelschnurblut mit CD105-angereichertem desselben Ursprungs verglichen. Im zweiten Versuch wurde CD105 durch Antisense-DNA (Antisense) geblockt und dann mit der Scrambled-Gruppe und einer Kontrollgruppe ohne DNA-Transfektion verglichen.

Im ersten Experiment (Abb. 17) zeigte sich, dass die CD105-selektierten hMSC eine signifikant verringerte Apoptoseaktivität gegenüber den nicht selektierten hMSC aufwiesen (CB $10,31 \pm 2,21$ % gegenüber CB105⁺ $5,59 \pm 1,55$ %, $p < 0,05$).

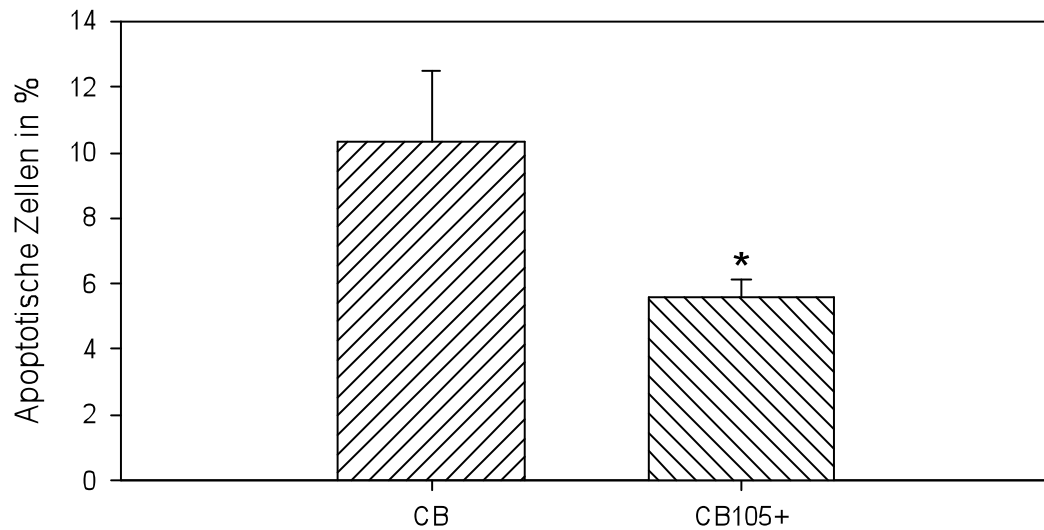


Abb 17: Apoptotische Zellen in Prozent nach 36 h Hypoxie. CB: hMSC aus Nabelschnurblut, CB105: CD105 angereicherte hMSC aus Nabelschnurblut, * $p < 0,05$

Im zweiten Versuch (Abb. 18 und 19) wiesen die mit CD105-Antisense-DNA behandelten hMSC mehr Apoptosen auf als vergleichbare hMSC, die nur mit Scrambled-DNA transfiziert wurden (Antisense $4,29 \pm 0,86$ % gegenüber Scrambled $1,71 \pm 0,40$ % $p < 0,05$). Die Kontrollgruppe, die nur mit Lipofektionsreagentien, aber nicht mit DNA behandelt wurde, wies einen tendenziell geringeren Anteil apoptotischer Zellen als die Antisense-Gruppe auf (Kontrolle $2,72 \pm 0,44$ %). Eine Signifikanz konnte aber nicht gezeigt werden.

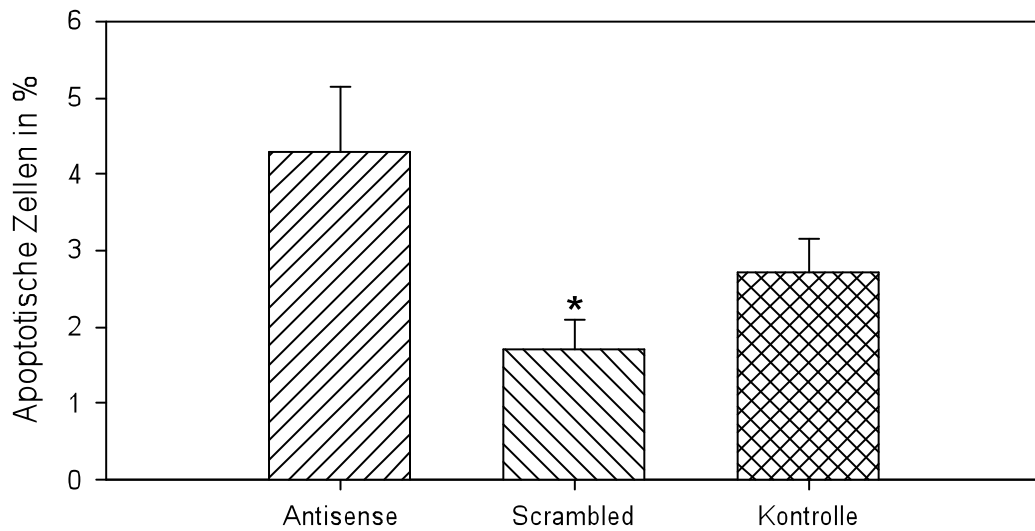


Abb 18: Apoptotische Zellen in Prozent nach 36 h Hypoxie und Serumentzug. Partiiell CD105-geblockte hMSC (*Antisense*) weisen eine signifikant höhere Apoptoserate auf als hMSC, die mit Scrambled-DNA behandelt wurden, * $p < 0,05$

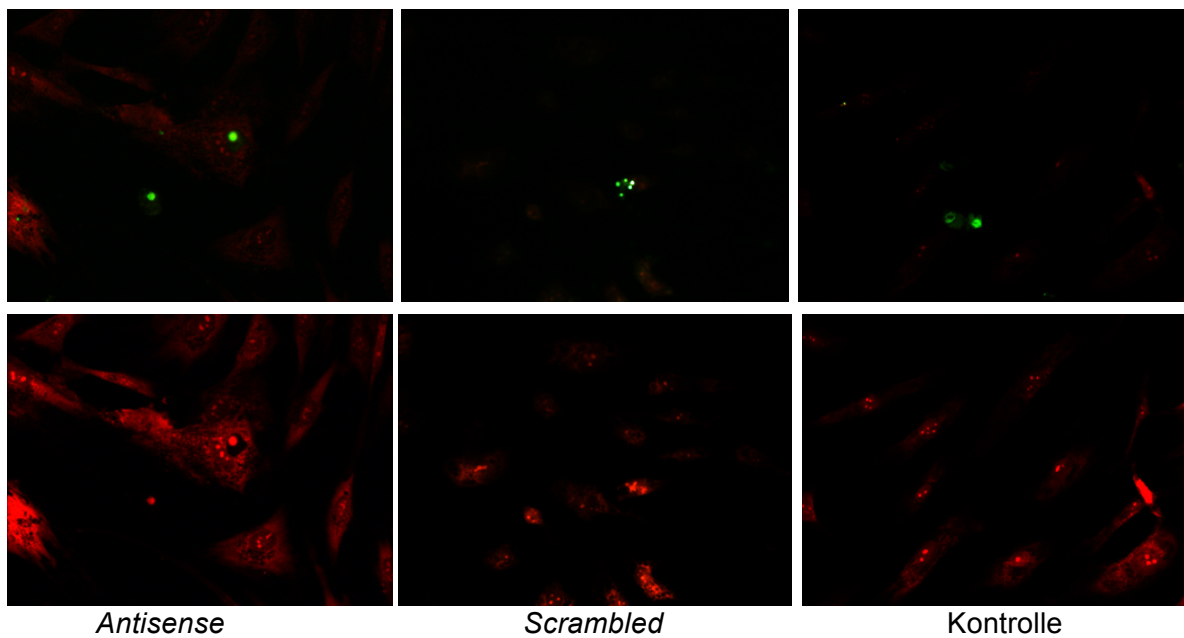


Abb. 19: Repräsentative Bilder der TUNEL-Färbung (grün) an hMSC nach 36 h Hypoxie in der oberen Reihe; untere Reihe: gleicher Bereich mit Darstellung aller Zellen mittels Propidiumjodid (rot)

3.5. Transfektionseffizienz

Um die Effizienz der Transfektion abschätzen zu können wurde parallel zur DNA auch mit einem Plasmid transfiziert, welches für das GFP (*Green Flourescent Protein*) codiert. Unter dem Floureszenzmikroskop (Abb. 20) wurde nach 24h der Anteil fluoreszierender Zellen (= transfizierter Zellen) ermittelt.

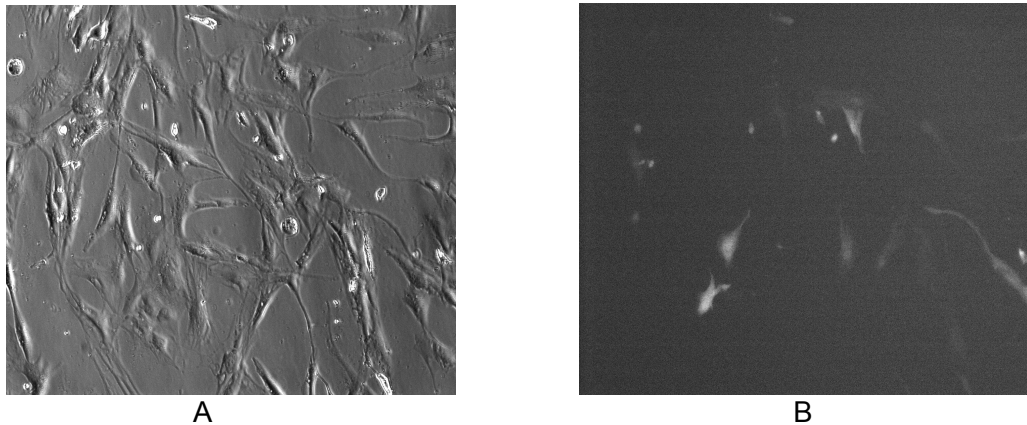


Abb. 20: hMSC 24 h nach Transfektion mit einem GFP-Plasmid. (A) Lichtmikroskopische Aufnahme, (B) Fluoreszenzmikroskop im 520 nm-Emissionsfilter

Im exemplarischen Versuch betrug der Anteil der transfizierten Zellen $11,8 \pm 1,7 \%$. Die Expression von CD105 nach Transfektion wurde durchflusszytometrisch überprüft. Wie in Abbildung 21 ersichtlich, konnte keine Reduktion der CD105-Expression gefunden werden. Der Anteil der CD105-positiven Zellen entspricht in allen drei Gruppen ca. 90% (*Antisense* $91,2 \pm 2,4 \%$, *Scrambled* $88,7 \pm 3,0 \%$ und Kontrolle $91,2 \pm 2,8 \%$)

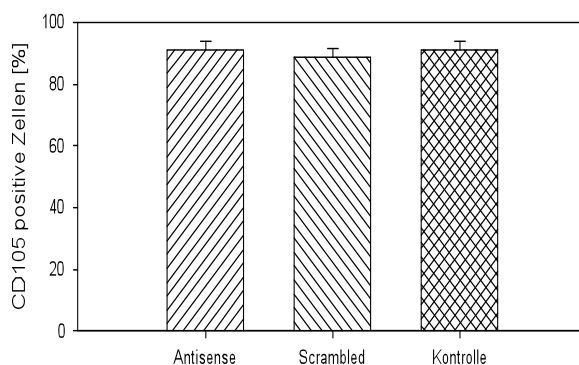


Abb. 21: FACS-Analyse: CD105-positive Zellen nach 24 h Transfektion.

3.6. *Tube forming Assay*

Für den *Tube forming Assay* wurden aus Fettgewebe und Knochenmark stammende hMSC verwendet und mit Antisense-ODN behandelt, wie weiter oben beschrieben. Anschließend erfolgte die Aussaat der Zellen in *Matrigel*[®], Beobachtung über sieben Tage und tägliche Fotodokumentation. Ziel war es, zu untersuchen, ob sich die drei Gruppen, CD105⁺(*Scrambled*), CD105-(*Antisense*) und Kontrollgruppe (ohne ODN), hinsichtlich ihrer angiogenetischen Eigenschaften unterscheiden (Abb. 22).

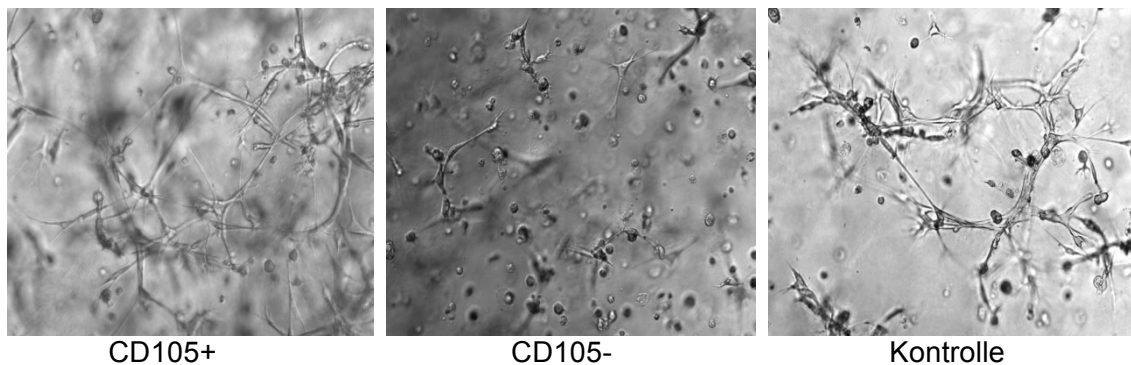


Abb. 22: Netzwerkformation unter dem Lichtmikroskop (400x)

In Abbildung 23 ist der Verlauf der Netzwerklänge pro Gesichtsfeld über sieben Tage dargestellt. In allen drei Gruppen verzehnfacht sich die Netzwerklänge von Tag eins bis Tag sieben. Hierbei lässt sich allerdings kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen feststellen. Zwischen Tag vier und sechs liegt die Netzwerklänge der Gruppe CD105+ tendenziell über der der Gruppe CD105-. Am Tag sieben nivelliert sich dieser Effekt allerdings wieder.

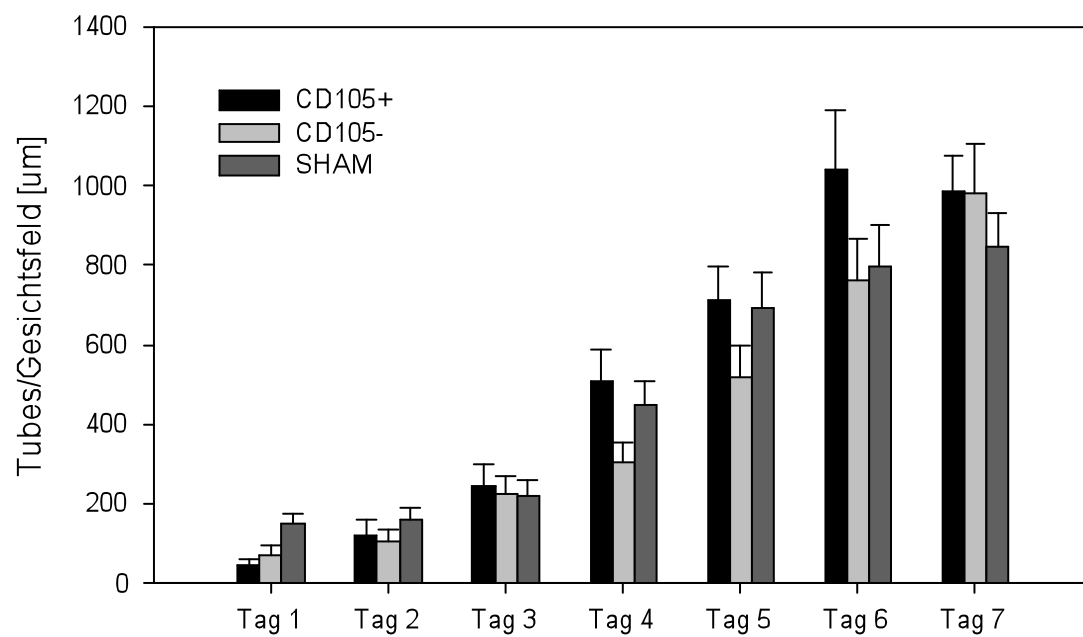


Abb. 23: Netzwerklänge pro Gesichtsfeld in µm (n = 3).

4. Diskussion

4.1. CD105 verringert die Infarktgröße und erhöht die Angiogenenese

CD105 ist Modulator des TGF- β -Signalweges und proangiogenetischer Marker. Es sollte untersucht werden, inwieweit CD105-präselektionierte hMSC das kardiale Remodeling und die Angiogenenese nach Myokardinfarkt beeinflusst.

Als Modell wurde der experimentell induzierte Myokardinfarkt an der Maus gewählt. Die induzierte Infarktgröße in den Kontrolltieren entspricht in etwa denen in der Literatur [113, 114]. Die CB-MSC wurden direkt in die Grenzzone des Infarktes implantiert. Henning und Kollegen hatten untersucht, welche Applikationsart für Nabelschnurblutzellen (UCBC) am effektivsten in der Therapie eines Herzinfarktes an Ratten ist. Die intramyokardiale Applikation von 4.000.000 Zellen erwies sich hier als die Effektivste [115]. Das Herz einer Ratte ist etwa zehnmal größer als das der Maus, sodass sich für ein Zehntel der Dosis entschieden wurde. Da CD105 besonders in der Infarktfrühphase vermehrt von Endothelzellen exprimiert wird, erscheint die Gabe im unmittelbaren Anschluss an die LAD-Ligatur sinnvoll [116].

Als Basis dieser Arbeit dienten die Erkenntnisse von Kern *et al.*, welche zeigen konnten, dass CB-MSC weniger CD105 exprimieren als BM-MSC. Unter Verwendung der gleichen Zellen konnten diese Unterschiede in der FACS-Analyse reproduziert werden und es stellte sich die Frage, ob dies Auswirkungen auf das regenerative Potential der CB-MSC in der Myokardinfarkttherapie hat [40, 117, 118]. Es gibt aber auch Arbeiten, die keine Unterschiede zwischen CB- und BM-MSC gefunden haben. Entsprechend diesen Arbeiten exprimieren weit über 90 % der CB-MSC CD105 [119, 120]. Chen *et al.* [119] hatten allerdings die MSC nicht aus dem Nabelschnurblut sondern aus Wharton-Sulze gewonnen, sodass es sich um eine andere Zellpopulation handeln könnte. Kadam *et al.* [118] diskutierten die Möglichkeit, dass die MSC-Populationen durch CD105-positive Endothelzellen kontaminiert sind. Sie selbst hatten nur CD105-negative MSC gefunden.

Um eine Immunantwort auf die injizierten humanen CB-MSC zu verhindern, fiel die Wahl auf immundefiziente SCID-Mäuse. Nach 6 Wochen wurden die Mäuse euthanasiert und histologisch die Infarktgröße und die Kapillardichte im Herzen bestimmt.

Durch die Applikation von CD105⁺-angereicherten CB-MSC kam es zu einer signifikanten Verringerung der Infarktgröße gegenüber der Kontrollgruppe. Für die Therapie mit unbehandelten CB-MSC war die Verbesserung nur tendentiell. CD105 ist ein Modulator der TGF- β -Signalübertragung. In der Infarktnarbe korreliert ein erhöhter Nachweis von TGF- β 1 und Smad2, 3 und 4 mit einer verstärkten Kollagenablagerung [121]. CD105 könnte diesen Signalweg hemmen. Es wurde beschrieben, dass CD105 die Fibrose unter *in-vitro*-Bedingungen reduzieren kann. Guerrero-Esteo und Kollegen [102] zeigten, dass die Überexpression von CD105 auf Mausfibroblasten über eine Hemmung von PAI-1 zu einer verminderten Produktion von Extrazellulärmatrix führt. Außerdem verschiebt CD105 die Signalübertragung von TGF- β -1 in Richtung des ALK1/Smad1/5-Weges durch Hemmung des ALK5/Smad3-Weges, welcher als Ziel das PAI-1-Gen hat [122]. Induziert man bei PAI-1-Knockout-Mäusen einen Myokardinfarkt, ist die Fibrose im Rahmen des kardialen Remodelings deutlich geringer ausgeprägt als in Wildtypmäusen [123]. Dieser Mechanismus könnte die kleinere Infarktnarbe bei mit CD105-angereicherten CB-MSC behandelten Tieren erklären. Auch in anderen Zellen, wie etwa Chondrozyten [124] oder glomerulären Mesangialzellen [125], führt eine Überexpression von CD105 zu einer Hemmung der Produktion von EZM.

Es gibt allerdings auch Publikationen, die in die andere Richtung weisen und CD105 eine profibrotische Rolle zuschreiben. Chen *et al.* [126] wiesen eine Hochregulation von CD105 durch Inkubation von kardialen Fibroblasten mit Angiotensin II nach. CD105 vermittelte in diesem Fall eine vermehrte Kollagen-1-Produktion und Inhibition von MMP-1. Dass nur diese beiden Substrate als Indikatoren für den Umsatz der EZM bestimmt wurden, schränkt die Aussagekraft dieses Experimentes ein. So ist nicht auszuschließen, dass der antifibrotische Effekt von CD105 über einen anderen Mechanismus vermittelt wird.

In Fibroblasten von Patienten mit systemischer Sklerose konnten Morris und Kollegen [127] eine Hochregulation von CD105 zeigen und vermuten eine profibrotische Wirkung via des ALK1/Smad1-Signalweges. Einschränkend bemerken sie aber, dass bei der systemischen Sklerose eine Vielzahl von Störungen in der TGF- β -Signalübertragung vorkommt. In gesunden Fibroblasten hat CD105 keinen verstärkenden Einfluss auf die Kollagenproduktion. Dagegen wurde in einer früheren Publikation durch eine andere Arbeitsgruppe die Hochregulation von CD105 bei der systemischen Sklerose als Ausdruck eines negativen Feedbackmechanismus gesehen, welcher die weitere Induktion von profibrotischen Genen durch TGF- β verhindert [128].

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Infarktgröße durch Implantation von

aufgereinigten CD105⁺ CB-MSc verkleinert werden konnte. Wahrscheinlich wird diese Wirkung über Modulation der TGF- β /ALK/Smad-Signalstrecke erzeugt. Der genaue Mechanismus, wie CD105⁺-CB-MSc ihren positiven Effekt in der Behandlung von infarziertem Myokard entfalten, bleibt Gegenstand der Forschung. Sinnvoll wäre eine molekulargenetische Aufklärung, inwieweit die Signalwege in CD105-überexprimierenden MSc verändert sind und ob sich durch Kokultivierung mit Kardiomyozyten beziehungsweise kardialen Fibroblasten die EZM-Produktion beeinflussen lässt.

Für die Messung der Kapillardichte zeigte sich ein ähnliches Bild wie in der Infarktgrößenbestimmung. In der CD105⁺-CB-MSc-Gruppe ist die Kapillarzahl sowohl in der Infarktgrenzzone als auch im übrigen Myokard signifikant höher als in der Kontroll- und der CB-Gruppe. CB-MSc selbst konnten gegenüber der Kontrollgruppe keine signifikante Erhöhung der Kapillardichte bewirken.

Dieses Ergebnis deckt sich mit einer Studie aus dem Jahr 2006 von *Warrington et al.*, in der CD105-haploinsuffizienten Mäusen ein Myokardinfarkt induziert wurde und die Auswirkungen auf Postinfarktangiogenese und die Herzfunktion untersucht wurden. In den haploinsuffizienten Mäusen war CD105 weniger hochreguliert, die Kapillardichte im Infarktgebiet geringer und die Herzfunktion schlechter. Einem Teil der haploinsuffizienten Mäuse wurden humane mononukleäre Zellen (MNC) von gesunden Patienten beziehungsweise Patienten mit einer hereditären hämorrhagischen Teleangiektasie 1 (HHT-1), also mit einem Endoglinmangel, systemisch implantiert. Nach Applikation der gesunden MNC kam es zu einer signifikanten Erhöhung der Kapillardichte und Verbesserung der Herzfunktion. Unter HHT-1-MNC-Gabe blieb dieser Effekt aus. Das *Homing* der MNC in das Infarktgebiet war gleichfalls schlechter [90]. Von den MNC ist nur ein geringer Teil als MSc anzusehen. Darüber hinaus bestehen weitere methodische Unterschiede, wie die fehlende Kultivierung der Zellen prätherapeutisch, die Verwendung von CD105-haploinsuffizienten Mäusen und die Immunsuppression mittels Tacrolimus. Trotzdem zeigen *Warringtons* Ergebnisse und die hier vorgelegte Studie, dass eine Minderexpression von CD105 in den applizierten Zellen zu einem schlechteren *Outcome* nach Myokardinfarkt führt.

Auch scheint CD105 gerade in der Frühphase nach Infarkt eine besondere Rolle zu spielen, da es hier in den proliferierenden Endothelzellen hochreguliert ist [116].

Die Ansicht, dass CD105 die Proliferation und Migration von Endothelzellen und HUVEC und damit die Angiogenese fördert, wird durch verschiedene *In-vitro*-Versuche gestützt [97, 103-105]. Die Signalmodulation erfolgt analog zu der bereits weiter oben

beschriebenen CD105/ALK1/SMAD1/5-Signalkaskade [129]. Zwei einzelne Publikationen widersprechen dieser Sichtweise zwar nicht in der Art der aktivierten Signalkaskade, aber in deren Ergebnis. Pece-Barbara [130] und Lee [131] fanden eine verminderte Proliferation und Migration von Endothelzellen, welche kein CD105 exprimieren. Wahrscheinlich adaptieren sich der TGF- β -Rezeptorkomplex und seine nachgeschalteten Signalmoleküle in unterschiedlicher Weise, je nach Technik, über die CD105 ausgeschaltet wurde. Die beiden letztgenannten Arbeitsgruppen sammelten embryonale Endothelzellen von CD105-defizienten Mausembryos (MEEC), die sonst am Gestationstag 10 gestorben wären. Es sind also Zellen die primär an das Fehlen von CD105 angepasst sind. Im Gegensatz dazu verwendeten die erstgenannten Gruppen siRNA, *Antisense*-ODN oder -DNA. Hier handelt es sich somit um Endothelzellen, in denen CD105 sekundär eliminiert und dem vorher physiologisch funktionierenden Rezeptorkomplex entzogen wird. Dies kann die widersprüchlichen Ergebnisse erklären. Es konnte erstmals gezeigt werden, dass die Expression von CD105 ein Unterscheidungsmerkmal im Regenerationspotential von CB-MSC hinsichtlich der Angiogenese nach Myokardinfarkt ist. Zu klären bleibt, über welchen Mechanismus MSC diese Wirkung entfalten, da wahrscheinlich nur ein geringer Teil der MSC selbst an der Angiogenese Teil nimmt. Anzunehmen ist, dass dies über die parakrine Sekretion von Faktoren erfolgt. Für zukünftige Arbeiten wäre eine Versuchsanordnung mit Kokultivierung von MSC und Endothelzellen denkbar. Durch Vergleich mit CD105-überexprimierenden Zellen sollte auf pro- und antiangiogenetische Faktoren, die direkte Zell-MSC-Interaktion und Transdifferenzierung von MSC getestet werden.

4.2. Echtzeitazidifikation und Zelladhäsion

Mit Hilfe des BIONAS-Systems lassen sich bestimmte Veränderungen sowohl im Zellmetabolismus als auch in der –morphologie in Echtzeit beobachten. Ziel dieses Versuches war es, herauszufinden, ob CD105-angereicherte CB-MSC (CD105⁺-CB-MSC) hypoxische Bedingungen besser tolerieren als normale CB-MSC. Als Parameter wurde die Veränderung des extrazellulären pH-Wertes (Azidifikationsrate) gewählt. Da unter Hypoxie keine Atmung stattfinden kann, ist allein die Glykolyse Ursache der Ansäuerung. Die resultierende Laktatproduktion führt nach Sekretion in den Extrazellulärraum zu einem Abfall des pH-Wertes. Die ansteigende Glykolyse deutet damit auf einen erhöhten Metabolismus der Zelle hin. Dies kann zum einen eine erhöhte Aktivität der Zelle als Ursache haben, aber auch eine Stressantwort dieser Zelle sein. So ist zu beobachten,

dass Neuroblastomzellen kurz vor dem Zelltod einen erhöhten Metabolismus zeigen [132]. Der zweite Parameter, welcher untersucht wurde, ist die Impedanz. Diese ist ein Maß für die Zell-Zell-Kontakte und Adhäsion der Zellen.

Unter Hypoxie zeigte sich, dass die CB-MSCs gegenüber den CD105⁺-CB-MSCs eine deutlich erhöhte Ansäuerungsrate aufwiesen und somit auch eine erhöhte metabolische Aktivität. Gleichzeitig stieg auch ihre Impedanz gegenüber den CD105⁺-CB-MSCs.

Mylotte und Kollegen fanden heraus, dass MSCs unter hypoxischen Bedingungen länger überleben (> 48 h) als Kardiomyozyten. Dabei wiesen sie eine deutlich gesteigerte Glykolyse auf, um so den ATP-Vorrat stabil zu halten und ihr Überleben zu sichern [133].

Die Ergebnisse zeigen, dass die Azidifikationsrate der CD105⁺-CB-Gruppe sogar zunächst abfällt. Das deutet darauf hin, dass sie ihren Metabolismus herunterregulieren. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen ist die Eigenschaft von CD105, antiapoptotische Faktoren, wie Bcl-2 oder Bcl-xl, hochzuregulieren. Bcl-2 führt zu einer Art metabolischem Arrest der Zelle, sodass weniger ATP verbraucht wird, weniger Glykolyse notwendig ist und eine intrazelluläre Ansäuerung verhindert wird [134, 135].

Weiterhin zeigt sich, dass die Ansäuerungsrate der nicht CD105 angereicherten CB-MSCs von anfänglich 180% der Basisrate langsam auf 140% fällt. Dies könnte ein Indiz dafür sein, dass sich die Glukosevorräte erschöpfen. Der Anstieg der Zelladhäsion wirkt in diesem Zusammenhang zunächst widersprüchlich. Dieser Widerspruch ist aber der Messmethode geschuldet. Das Medium auf den Zellen wird zyklisch ausgetauscht, sodass kein saures Milieu entsteht und die Zellen unter gesteigerter Glykolyse proliferieren können. In einem ischämischen Myokardareal findet sich aber eine nur unzureichende Perfusion, sodass es zu einer progressiven Ansäuerung und in dessen Folge zum Zelluntergang kommt.

Das wird auch durch die eigenen Apoptoseversuche unterstrichen, in denen MSCs mit geringerer CD105-Expression eine höhere Apoptoserate nach 36 h Hypoxie haben.

Zusammenfassend gibt dieser Versuch Indizien, dass Hypoxie bei CD105-präselektionierten CB-MSCs zu einem reduzierten Metabolismus führt, gekennzeichnet durch eine verminderte Glykolyse. Dieses Verhalten kann in einer Umgebung, wie dem hypoxischen Myokard, als Überlebensvorteil gelten.

Der genaue Mechanismus, über den CD105 in den Stoffwechsel der MSCs eingreift, sollte Gegenstand weiterer, insbesondere molekularbiologischer Untersuchungen sein.

4.3. Transfektionsrate

Im Gegensatz zu den vorherigen Experimenten mit einer Verstärkung der CD105-Expression durch Selektionierung einer CD105-Positivfraktion aus CB-MSC wurden nun die von Natur aus CD105-hochexprimierenden MSC aus Fettgewebe gewählt, um die CD105-mRNA mittels Antisense-Oligodesoxyribonukleotid (ODN) zu blockieren. Mit dieser entgegengesetzten Methodik war zu verifizieren, ob die Expression von CD105 tatsächlich ein Unterscheidungsmerkmal im Regenerationspotential mesenchymaler Stammzellen ist. Die MSC wurden mittels Lipofektion (Lipofectamin 2000) transfiziert. Diese Methode ist einfach anzuwenden und besitzt in den verschiedensten Zelltypen hohe Transfektionsraten. In hMSC liegt diese bei bis zu 35 % bei gleichzeitig niedriger Toxizität. Außerdem verlieren die MSC auch nach Lipofektion nicht ihre Multipotenz [136]. Im exemplarischen Versuch mit GFP-Plasmiden zeigte sich eine Transfektionseffizienz von circa 10 %. Das liegt zwar deutlich unter der maximalen in der Literatur beschriebenen Rate von 35 %, lässt sich aber mit der fortgeschrittenen Passage erklären. Auch Madeira *et al.* [136] stellten fest, dass die Zahl GFP-positiver MSC mit zunehmender Passage abnimmt, wobei aber die Zahl der transfizierten intrazellulären GFP-Plasmid-Kopien konstant bleibt. Die Ursache hierfür ist wohl auf Transkriptionsebene zu suchen. Der genaue Mechanismus dafür ist nicht bekannt.

Die Transfektionsrate von 10 % konnte mittels Durchflusszytometrie nicht bestätigt werden. Es waren keine signifikanten Unterschiede in der CD105-Expression feststellbar. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass die Antisense-ODN zwar transfiziert wurden und auch zur Translationsblockade von CD105 geführt haben, der Effekt jedoch nicht groß genug war, um durchflusszytometrisch erfasst zu werden.

Die verwendete Antisense-ODN wurde in zwei anderen Arbeiten erfolgreich eingesetzt und führte zu einer Reduktion der CD105-Expression von 60 % sowohl im Durchflusszytometer als auch im Western Blot [103, 104]. Die Gruppe um Kim und Kollegen identifizierte außerdem *small interfering RNA* als effektive Methode um eine transiente Blockade zu erreichen [137].

Andere mögliche Transfektionsmethoden sind die Elektroporation oder virale Vektoren. Letztere waren für den hier untersuchten Gegenstand ungeeignet, da ein entsprechender Vektor in seiner Herstellung sehr aufwändig und zudem potentiell mutagen ist. Die Elektroporation zeigt wiederholt hohe Transfektionsraten von bis zu 60 % in hMSC, allerdings bei hoher Zellletalität von ebenfalls 60 % [138, 139]. Die hohe Toxizität war auch der Grund, sich gegen die Elektroporation zu entscheiden. Eine weniger aggressive

Transfektionmethode sind sogenannte modifizierte Polyaminoester. Laut Literatur haben sie eine ähnliche Transfektions- und Toxizitätsrate wie die Lipofektion, sind aber nicht kommerziell verfügbar [140].

Zusammenfassend ist festzustellen, dass sich 10 % der hMSC mittels Lipofektion transfizieren ließen. Obwohl sich durchflusszytometrisch keine Verringerung der CD105-Expression zeigt, kann man von einem Effekt ausgehen, da sich die CD105-geblockten Zellen in den Experimenten ähnlich verhielten, wie nicht angereicherte Zellen.

4.4. CD105 reduziert die Apoptose unter Hypoxie

Li et al. [104] hatten über einen Antisense-Ansatz CD105 in humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen (HDMEC) antagonisiert und waren zu dem Ergebnis gekommen, dass in humanen Endothelzellen eine verminderte Expression von CD105 zu einer höheren Apoptoserate unter Hypoxiebedingungen *in vitro* führt. Darüber hinaus konnten sie eine Hochregulation bei Hypoxie von CD105 auf RNA- und Proteinebene nachweisen. In die gleiche Richtung weisen Untersuchungen von Warrington und Kollegen [105]. Laut dieser Publikation wirkt CD105 antiapoptotisch in bestrahlten Endothelzellen unter Hypoxie. Um die Reaktion der hMSC in Abhängigkeit von ihrer CD105-Expression unter Hypoxie zu analysieren, wurde eine Hypoxiekammer genutzt, in der durch Flutung mit Stickstoff der Sauerstoff ausgetauscht wurde. Dies sollte die Bedingungen im ischämischen Herzmuskel simulieren. Es wurden Zellen sowohl Zellen nach MACS[®]-Anreicherung als auch nach *Antisense*-ODN-Blockade von CD105 untersucht. Nach 36 h konnte gezeigt werden, dass in beiden Telexperimenten die Apoptoserate in der mit CD105⁺-CB-MSC angereicherten Population und in der Gruppe mit nicht blockierter CD105-Expression geringer ist. Somit ist eine vermehrte Expression von CD105 mit einem besseren Überleben der MSC unter Hypoxie verbunden.

Die gemessene Apoptoserate bewegt sich mit 2 bis 10 % der Zellen im Bereich anderer vergleichbarer Arbeiten, in denen die Apoptoserate von 2,5 bis 15 % reicht [141, 142]. Die Vergleichbarkeit ist allerdings durch unterschiedliche Dauer der Hypoxie, Seren und anderer Apoptosenachweismethoden eingeschränkt. *Potier et al.* setzten die Zellen länger (48 h) hypoxischen Bedingungen und Serumentzug aus. Als Apoptosenachweis wurde ein Kit mit Calcein AM benutzt und danach die apoptotischen Zellen mikroskopisch ausgezählt. Die höhere Apoptoserate in dieser Arbeit von circa 12 % lässt sich gut mit der längeren Hypoxiedauer vereinbaren. *Rosova* und Kollegen setzten die Zellen nur für 16 h Hypoxie und Serumentzug aus. Zur Messung der Apoptoserate wurde eine

durchflusszytometrisch gestützte Methode mit Annexin V verwendet, welche eine andere Sensitivität und Spezifität als der in der eigenen Arbeit eingesetzte TUNEL-Assay hat. Nach Blockade von CD105 mittels Antisense-ODN liegt die Apoptoserate zwischen 2 und 4 %, während sie in der Negativfraktion nach MACS-Anreicherung spürbar höher liegt (5 bis 10 %). Eine mögliche Erklärung ist, dass in den beiden Experimenten zur CD105-Anreicherung einerseits und CD105-RNA-Blockierung andererseits MSC unterschiedlicher Ursprungsgewebe verwendet wurden. Wie weit diese auf hypoxischen Stress unterschiedlich reagieren, ist nicht bekannt. So wurden hMSC aus Nabelschnurblut bezüglich ihrer Hypoxietoleranz noch gar nicht untersucht. Außerdem wurden mittels Lipofektion *Antisense*-ODN eingeschleust. Diese Methode ist mit einer gewissen Zytotoxizität verbunden [143]. Es ist durchaus vorstellbar, dass durch diese „Präkonditionierung“ die MSC auf Hypoxie weniger sensibel reagieren.

Durch Erhöhung des antiapoptotischen Markers Bcl-2 und Reduktion des proapoptotischen p53 soll es zu diesem antiapoptotischen Effekt kommen. Dieser Mechanismus könnte auch in den hMSC gegriffen haben.

Bei der intramyokardialen Applikation von Stammzellen nach Myokardinfarkt besteht das Problem, dass ein großer Teil der Zellen nach wenigen Tagen durch Apoptose untergeht [45]. Da CD105 Einfluss auf die Apoptose von MSC laut den hier vorgelegten Untersuchungen hat, erscheint es sinnvoll, hMSC vor ihrem klinischen Einsatz auf die Expression von CD105 zu überprüfen. Im Fall des Einsatzes von CB-MSC ist eine Präselektionierung der CB-MSC bezüglich CD105 zu diskutieren. Eine solche Präselektionierung mittels MACS® wäre auch klinisch umsetzbar, da es für das MACS®-System bereits ein für die Anwendung am Menschen zertifiziertes System gibt [144]. Zudem wäre interessant, ob sich die Effektivität der MSC-Therapie durch Kombination mit anderen Methoden, wie zum Beispiel der hypoxischen Präkonditionierung [66] weiter verbessern lässt.

4.5. MSC formen Netzwerke

CD105 hat nachweislich proangiogenetische Eigenschaften in Endothelzellen [90, 100, 103]. In der Gegenwart von endothelialeem Wachstumsmedium (z.B. EGM-2) nehmen MSC einen endothelzellähnlichen Phänotyp an und formen in Matrigel™ kapillarähnliche Netzwerke oder Gefäße [145]. Deshalb sollte die Frage erörtert werden, ob CD105 Einfluss auf die Fähigkeit von MSC hat, solche Netzwerke zu bilden.

In MSC aus Knochenmark wurde mit Hilfe von Antisense-ODN die CD105-mRNA

blockiert. Die erhobenen Daten der Netzwerklängen aller drei Gruppen (CD105⁺, CD105- und SHAM) zeigen keine signifikanten Unterschiede. Tendenziell liegt allerdings die CD105⁺-Gruppe über den beiden anderen.

Der positive Einfluss von CD105 auf die angiogenetischen Fähigkeiten von Endothelzellen kann als bewiesen angesehen werden. Sowohl über einen *Antisense*-Ansatz als auch bei haploinsuffizienten Endothelzellen ist die Fähigkeit zur Bildung von kapillarähnlichen Strukturen bei Minderexpression von CD105 erheblich eingeschränkt [100, 103, 105]. Dieser Effekt ist umso stärker ausgeprägt, wenn TGF- β hinzugefügt wird. Diese Tatsache könnte auch erklären, warum im hier durchgeführten Versuch ein signifikanter Unterschied ausbleibt, da kein zusätzlicher TGF- β appliziert wurde. In GFR (*growth factor reduced*)-Matrigel® ist TGF- β in einer Konzentration von 1,7 ng/ml vorhanden. Dies entspricht einem Viertel der normalen Konzentration in Matrigel. Warrington *et al.* fügten allerdings TGF- β in einer Konzentration von 10ng/ml hinzu und erst damit wurden die Unterschiede zwischen der *Antisense*- und der Kontrollgruppe signifikant.

Erwähnt werden muss auch die Möglichkeit, dass es selbst bei höheren CD105-Unterschieden gegebenenfalls zu keinen Unterschieden in der Formierung von kapillarähnlichen Netzwerken kommt, wenn der proangiogenetische Effekt, welcher *in vivo* beobachtet wurde, auf parakrinen Eigenschaften der MSCs beruht.

5. Zusammenfassung

Humane multipotente Stromazellen sind ein vielversprechender Ansatz in der stammzellbasierten Therapie des Herzinfarktes. Humane MSC tolerieren in gewissen Grenzen ein sauerstoffarmes Milieu, wie es für das ischämische Myokard typisch ist. CD105 ist ein Oberflächenmolekül, welches als Co-Rezeptor des TGF- β -Rezeptorkomplexes dient. Unter Hypoxie erfährt es eine Hochregulierung und besitzt antiapoptotische sowie proangiogenetische Eigenschaften. Deshalb sollte in dieser Arbeit die Frage erörtert werden, welchen Einfluss CD105 auf das Regenerationspotential humaner CB-MSC hat.

Für die *in-vivo*-Versuche wurde ein etabliertes Mausmyokardinfarktmodell gewählt, in welchem nach Infarktinduktion CB-MSC intramyokardial appliziert wurden. Nach 6 Wochen wurden die Infarktgröße und die kapilläre Dichte in den Mäuseherzen histologisch bestimmt. In den *in-vitro*-Versuchen sollte unter Hypoxie das metabolische Verhalten sowie die Apoptoserate Aufschluss über den Effekt von CD105 auf MSC geben und angiogenetische Eigenschaften in Matrigel untersucht werden.

Während CB-MSC, welche im Vergleich zu anderen MSC weniger CD105 exprimieren, die Infarktgröße nicht signifikant verringern konnten, führte die CD105-Positivfraktion der CB-MSC zu einer Verkleinerung der Infarktnarbe. Ähnlich verhält es sich mit der kapillären Dichte, welche sich nur unter der Gabe von CD105-CB-MSC signifikant verbesserte. *In-vitro* nahm die metabolische Aktivität und konkordant die Apoptoserate der CD105⁺-CB-MSC unter Hypoxie ab. Lediglich in den *Tubeforming*-Assays konnten keine Unterschiede zwischen beiden Gruppen gefunden werden.

Damit bestätigen die Ergebnisse die in der Literatur beschriebenen positiven Auswirkungen von CD105 auf Apoptose, Angiogenese und metabolische Aktivität erstmals auch in hMSC aus Nabelschnurblut und zeigten, dass CD105 das regenerative Potential dieser Zellen beeinflusst.

Ob sich eine solche Präselektionierung von CB-MSC auch positiv auf die Morbidität und das Gesamtüberleben nach Myokardinfarkt auswirkt, müssen sowohl tierexperimentelle als auch klinische Studien zeigen, welche diese Endpunkte untersuchen.

Literaturverzeichnis

1. Herold, G., *Innere Medizin - Eine vorlesungsorientierte Darstellung*. 2007, Köln: Gerd Herold. 867.
2. Allender, S., et al., *European cardiovascular disease statistics*. 2008, European Heart Network.
3. van der Wal, A.C., et al., *Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaques is characterized by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology*. *Circulation*, 1994. **89**(1): S. 36-44.
4. Galis, Z.S. and J.J. Khatri, *Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad and the ugly*. *Circulation Research*, 2002. **90** (6): p. 251-262 .
5. Burke, A.P., et al., *Coronary risk factors and plaque morphology in men with coronary disease who died suddenly*. *N Engl J Med*, 1997. **336**(18): p. 1276-82.
6. Falk, E., P.K. Shah, and V. Fuster, *Coronary plaque disruption*. *Circulation*, 1995. **92**(3): p. 657-71.
7. Libby, P., *Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes*. *Circulation*, 2001. **104**(3): p. 365-72.
8. Reimer, K.A., et al., *The wavefront phenomenon of ischemic cell death. 1. Myocardial infarct size vs duration of coronary occlusion in dogs*. *Circulation*, 1977. **56**(5): p. 786-94.
9. Hedstrom, E., et al., *Infarct evolution in man studied in patients with first-time coronary occlusion in comparison to different species - implications for assessment of myocardial salvage*. *J Cardiovasc Magn Reson*, 2009. **11**: p. 38.
10. De Luca, G., et al., *Time delay to treatment and mortality in primary angioplasty for acute myocardial infarction: every minute of delay counts*. *Circulation*, 2004. **109**(10): p. 1223-5.
11. McMurray, J.J., et al., *ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC*. *Eur J Heart Fail*, 2012. **14**(8): p. 803-69.
12. Cohn, J.N., R. Ferrari, and N. Sharpe, *Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling*. *J Am Coll Cardiol*, 2000. **35**(3): p. 569-82.
13. Opie, L.H., et al., *Controversies in ventricular remodelling*. *Lancet*, 2006. **367**(9507): p. 356-67.

14. McKay, R.G., et al., *Left ventricular remodeling after myocardial infarction: a corollary to infarct expansion*. Circulation, 1986. **74**(4): p. 693-702.
15. Cohen, M.V., et al., *Favorable remodeling enhances recovery of regional myocardial function in the weeks after infarction in ischemically preconditioned hearts*. Circulation, 2000. **102**(5): p. 579-83.
16. Gaudron, P., et al., *Progressive left ventricular dysfunction and remodeling after myocardial infarction. Potential mechanisms and early predictors*. Circulation, 1993. **87**(3): p. 755-63.
17. Mitchell, G.F., et al., *Left ventricular remodeling in the year after first anterior myocardial infarction: a quantitative analysis of contractile segment lengths and ventricular shape*. J Am Coll Cardiol, 1992. **19**(6): p. 1136-44.
18. Anversa, P., G. Olivetti, and J.M. Capasso, *Cellular basis of ventricular remodeling after myocardial infarction*. Am J Cardiol, 1991. **68**(14): p. 7D-16D.
19. Cohn, J.N., *Cardiac remodeling: basic aspects*, in *UpToDate*, D.S. Basow, Editor. 2011, UpToDate, Waltham, MA.
20. Kai, H., et al., *Diastolic dysfunction in hypertensive hearts: roles of perivascular inflammation and reactive myocardial fibrosis*. Hypertens Res, 2005. **28**(6): p. 483-90.
21. Cohn, J.N., et al., *Plasma norepinephrine as a guide to prognosis in patients with chronic congestive heart failure*. N Engl J Med, 1984. **311**(13): p. 819-23.
22. Sadoshima, J. and S. Izumo, *Molecular characterization of angiotensin II--induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts. Critical role of the AT1 receptor subtype*. Circ Res, 1993. **73**(3): p. 413-23.
23. Brilla, C.G., et al., *Collagen metabolism in cultured adult rat cardiac fibroblasts: response to angiotensin II and aldosterone*. J Mol Cell Cardiol, 1994. **26**(7): p. 809-20.
24. Nian, M., et al., *Inflammatory cytokines and postmyocardial infarction remodeling*. Circ Res, 2004. **94**(12): p. 1543-53.
25. Sun, Y., et al., *Angiotensin II, transforming growth factor-beta1 and repair in the infarcted heart*. J Mol Cell Cardiol, 1998. **30**(8): p. 1559-69.
26. Deten, A., et al., *Changes in extracellular matrix and in transforming growth factor beta isoforms after coronary artery ligation in rats*. J Mol Cell Cardiol, 2001. **33**(6): p. 1191-207.
27. Bujak, M. and N.G. Frangogiannis, *The role of TGF-beta signaling in myocardial infarction and cardiac remodeling*. Cardiovasc Res, 2007. **74**(2): p. 184-95.
28. Matsumoto-Ida, M., et al., *Activation of TGF-beta1-TAK1-p38 MAPK pathway in spared cardiomyocytes is involved in left ventricular remodeling after myocardial infarction in rats*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006. **290**(2): p. H709-15.

29. Horwitz, E.M., et al., *Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement*. Cytotherapy, 2005. **7**(5): p. 393-5.
30. Bianco, P., P.G. Robey, and P.J. Simmons, *Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays*. Cell Stem Cell, 2008. **2**(4): p. 313-9.
31. Le Blanc, K., et al., *Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex*. Scand J Immunol, 2003. **57**(1): p. 11-20.
32. Dominici, M., et al., *Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement*. Cytotherapy, 2006. **8**(4): p. 315-7.
33. Friedenstein, A.J., R.K. Chailakhjan, and K.S. Lalykina, *The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells*. Cell Tissue Kinet, 1970. **3**(4): p. 393-403.
34. Zuk, P.A., et al., *Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells*. Mol Biol Cell, 2002. **13**(12): p. 4279-95.
35. Lee, O.K., et al., *Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood*. Blood, 2004. **103**(5): p. 1669-75.
36. Jiang, Y., et al., *Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain*. Exp Hematol, 2002. **30**(8): p. 896-904.
37. Sakaguchi, Y., et al., *Suspended cells from trabecular bone by collagenase digestion become virtually identical to mesenchymal stem cells obtained from marrow aspirates*. Blood, 2004. **104**(9): p. 2728-35.
38. Fan, C.G., et al., *Characterization and neural differentiation of fetal lung mesenchymal stem cells*. Cell Transplant, 2005. **14**(5): p. 311-21.
39. Toma, J.G., et al., *Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin*. Nat Cell Biol, 2001. **3**(9): p. 778-84.
40. Kern, S., et al., *Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue*. Stem Cells, 2006. **24**(5): p. 1294-301.
41. Chang, Y.J., et al., *Disparate mesenchyme-lineage tendencies in mesenchymal stem cells from human bone marrow and umbilical cord blood*. Stem Cells, 2006. **24**(3): p. 679-85.
42. Crisan, M., et al., *A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs*. Cell Stem Cell, 2008. **3**(3): p. 301-13.
43. De Bari, C., et al., *Skeletal muscle repair by adult human mesenchymal stem cells from synovial membrane*. J Cell Biol, 2003. **160**(6): p. 909-18.

44. Hoffmann, A., et al., *Neotendon formation induced by manipulation of the Smad8 signalling pathway in mesenchymal stem cells*. J Clin Invest, 2006. **116**(4): p. 940-52.
45. Toma, C., et al., *Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart*. Circulation, 2002. **105**(1): p. 93-8.
46. Hofstetter, C.P., et al., *Marrow stromal cells form guiding strands in the injured spinal cord and promote recovery*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(4): p. 2199-204.
47. Di Nicola, M., et al., *Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli*. Blood, 2002. **99**(10): p. 3838-43.
48. Ohtaki, H., et al., *Stem/progenitor cells from bone marrow decrease neuronal death in global ischemia by modulation of inflammatory/immune responses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(38): p. 14638-43.
49. Constantin, G., et al., *Adipose-derived mesenchymal stem cells ameliorate chronic experimental autoimmune encephalomyelitis*. Stem Cells, 2009. **27**(10): p. 2624-35.
50. Du, Y.Y., et al., *Immuno-inflammatory regulation effect of mesenchymal stem cell transplantation in a rat model of myocardial infarction*. Cytotherapy, 2008. **10**(5): p. 469-78.
51. Shake, J.G., et al., *Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects*. Ann Thorac Surg, 2002. **73**(6): p. 1919-25; discussion 1926.
52. Meirelles Lda, S., et al., *Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells*. Cytokine Growth Factor Rev, 2009. **20**(5-6): p. 419-27.
53. Hattan, N., et al., *Purified cardiomyocytes from bone marrow mesenchymal stem cells produce stable intracardiac grafts in mice*. Cardiovasc Res, 2005. **65**(2): p. 334-44.
54. Hakuno, D., et al., *Bone marrow-derived regenerated cardiomyocytes (CMG Cells) express functional adrenergic and muscarinic receptors*. Circulation, 2002. **105**(3): p. 380-6.
55. He, X.Q., et al., *Co-culture with cardiomyocytes enhanced the myogenic conversion of mesenchymal stromal cells in a dose-dependent manner*. Mol Cell Biochem, 2010. **339**(1-2): p. 89-98.
56. Labovsky, V., et al., *Cardiomyogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal cells: Role of cardiac extract from neonatal rat cardiomyocytes*. Differentiation, 2010. **79**(2): p. 93-101.
57. Jumabay, M., et al., *Spontaneously beating cardiomyocytes derived from white mature adipocytes*. Cardiovasc Res, 2010. **85**(1): p. 17-27.

58. Ikegami, Y., et al., *Serum-independent cardiomyogenic transdifferentiation in human endometrium-derived mesenchymal cells*. Artif Organs, 2010. **34**(4): p. 280-8.
59. Roura, S., et al., *Exposure to cardiomyogenic stimuli fails to transdifferentiate human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells*. Basic Res Cardiol, 2010. **105**(3): p. 419-30.
60. Behfar, A., et al., *Guided cardiopoiesis enhances therapeutic benefit of bone marrow human mesenchymal stem cells in chronic myocardial infarction*. J Am Coll Cardiol, 2010. **56**(9): p. 721-34.
61. Tsuji, H., et al., *Xenografted human amniotic membrane-derived mesenchymal stem cells are immunologically tolerated and transdifferentiated into cardiomyocytes*. Circ Res, 2010. **106**(10): p. 1613-23.
62. Li, Z., et al., *Paracrine role for mesenchymal stem cells in acute myocardial infarction*. Biol Pharm Bull, 2009. **32**(8): p. 1343-6.
63. Shabbir, A., et al., *Heart failure therapy mediated by the trophic activities of bone marrow mesenchymal stem cells: a noninvasive therapeutic regimen*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2009. **296**(6): p. H1888-97.
64. Psaltis, P.J., et al., *Enrichment for STRO-1 expression enhances the cardiovascular paracrine activity of human bone marrow-derived mesenchymal cell populations*. J Cell Physiol, 2010. **223**(2): p. 530-40.
65. Chacko, S.M., et al., *Hypoxic preconditioning induces the expression of prosurvival and proangiogenic markers in mesenchymal stem cells*. Am J Physiol Cell Physiol, 2010. **299**(6): p. C1562-70.
66. Hu, X., et al., *Transplantation of hypoxia-preconditioned mesenchymal stem cells improves infarcted heart function via enhanced survival of implanted cells and angiogenesis*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2008. **135**(4): p. 799-808.
67. Li, J.H., N. Zhang, and J.A. Wang, *Improved anti-apoptotic and anti-remodeling potency of bone marrow mesenchymal stem cells by anoxic pre-conditioning in diabetic cardiomyopathy*. J Endocrinol Invest, 2008. **31**(2): p. 103-10.
68. Li, W., et al., *Bcl-2 engineered MSCs inhibited apoptosis and improved heart function*. Stem Cells, 2007. **25**(8): p. 2118-27.
69. Grinnemo, K.H., et al., *Xenoreactivity and engraftment of human mesenchymal stem cells transplanted into infarcted rat myocardium*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2004. **127**(5): p. 1293-300.
70. Min, J.J., et al., *In vivo bioluminescence imaging of cord blood derived mesenchymal stem cell transplantation into rat myocardium*. Ann Nucl Med, 2006. **20**(3): p. 165-70.
71. Chen, S.L., et al., *Improvement of cardiac function after transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cells in patients with acute myocardial infarction*. Chin Med J (Engl), 2004. **117**(10): p. 1443-8.

72. Hare, J.M., et al., *A randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation study of intravenous adult human mesenchymal stem cells (prochymal) after acute myocardial infarction*. J Am Coll Cardiol, 2009. **54**(24): p. 2277-86.
73. Gougos, A. and M. Letarte, *Biochemical characterization of the 44G4 antigen from the HOON pre-B leukemic cell line*. J Immunol, 1988. **141**(6): p. 1934-40.
74. Gougos, A., et al., *Identification of distinct epitopes of endoglin, an RGD-containing glycoprotein of endothelial cells, leukemic cells, and syncytiotrophoblasts*. Int Immunol, 1992. **4**(1): p. 83-92.
75. Adam, P.J., G.J. Clesham, and P.L. Weissberg, *Expression of endoglin mRNA and protein in human vascular smooth muscle cells*. Biochem Biophys Res Commun, 1998. **247**(1): p. 33-7.
76. Barry, F.P., et al., *The monoclonal antibody SH-2, raised against human mesenchymal stem cells, recognizes an epitope on endoglin (CD105)*. Biochem Biophys Res Commun, 1999. **265**(1): p. 134-9.
77. Lastres, P., et al., *Endoglin modulates cellular responses to TGF-beta 1*. J Cell Biol, 1996. **133**(5): p. 1109-21.
78. Qu, R., M.M. Silver, and M. Letarte, *Distribution of endoglin in early human development reveals high levels on endocardial cushion tissue mesenchyme during valve formation*. Cell Tissue Res, 1998. **292**(2): p. 333-43.
79. Cheifetz, S., et al., *Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells*. J Biol Chem, 1992. **267**(27): p. 19027-30.
80. Guerrero-Esteo, M., et al., *Extracellular and cytoplasmic domains of endoglin interact with the transforming growth factor-beta receptors I and II*. J Biol Chem, 2002. **277**(32): p. 29197-209.
81. Bellon, T., et al., *Identification and expression of two forms of the human transforming growth factor-beta-binding protein endoglin with distinct cytoplasmic regions*. Eur J Immunol, 1993. **23**(9): p. 2340-5.
82. Perez-Gomez, E., et al., *Characterization of murine S-endoglin isoform and its effects on tumor development*. Oncogene, 2005. **24**(27): p. 4450-61.
83. Lastres, P., et al., *Phosphorylation of the human-transforming-growth-factor-beta-binding protein endoglin*. Biochem J, 1994. **301** (Pt 3): p. 765-8.
84. McAllister, K.A., et al., *Endoglin, a TGF-beta binding protein of endothelial cells, is the gene for hereditary haemorrhagic telangiectasia type 1*. Nat Genet, 1994. **8**(4): p. 345-51.
85. Bourdeau, A., D.J. Dumont, and M. Letarte, *A murine model of hereditary hemorrhagic telangiectasia*. J Clin Invest, 1999. **104**(10): p. 1343-51.

86. Bourdeau, A., et al., *Potential role of modifier genes influencing transforming growth factor-beta1 levels in the development of vascular defects in endoglin heterozygous mice with hereditary hemorrhagic telangiectasia*. Am J Pathol, 2001. **158**(6): p. 2011-20.
87. Bourdeau, A., M.E. Faughnan, and M. Letarte, *Endoglin-deficient mice, a unique model to study hereditary hemorrhagic telangiectasia*. Trends Cardiovasc Med, 2000. **10**(7): p. 279-85.
88. Wang, J.M., et al., *A monoclonal antibody detects heterogeneity in vascular endothelium of tumours and normal tissues*. Int J Cancer, 1993. **54**(3): p. 363-70.
89. Krupinski, J., et al., *Role of angiogenesis in patients with cerebral ischemic stroke*. Stroke, 1994. **25**(9): p. 1794-8.
90. van Laake, L.W., et al., *Endoglin has a crucial role in blood cell-mediated vascular repair*. Circulation, 2006. **114**(21): p. 2288-97.
91. Burrows, F.J., et al., *Up-regulation of endoglin on vascular endothelial cells in human solid tumors: implications for diagnosis and therapy*. Clin Cancer Res, 1995. **1**(12): p. 1623-34.
92. Kumar, P., J.M. Wang, and C. Bernabeu, *CD 105 and angiogenesis*. J Pathol, 1996. **178**(4): p. 363-6.
93. Matsuno, F., et al., *Induction of lasting complete regression of preformed distinct solid tumors by targeting the tumor vasculature using two new anti-endoglin monoclonal antibodies*. Clin Cancer Res, 1999. **5**(2): p. 371-82.
94. Seon, B.K., et al., *Long-lasting complete inhibition of human solid tumors in SCID mice by targeting endothelial cells of tumor vasculature with antihuman endoglin immunotoxin*. Clin Cancer Res, 1997. **3**(7): p. 1031-44.
95. Tabata, M., et al., *Antiangiogenic radioimmunotherapy of human solid tumors in SCID mice using (125)I-labeled anti-endoglin monoclonal antibodies*. Int J Cancer, 1999. **82**(5): p. 737-42.
96. Barbara, N.P., J.L. Wrana, and M. Letarte, *Endoglin is an accessory protein that interacts with the signaling receptor complex of multiple members of the transforming growth factor-beta superfamily*. J Biol Chem, 1999. **274**(2): p. 584-94.
97. Lebrin, F., et al., *Endoglin promotes endothelial cell proliferation and TGF-beta/ALK1 signal transduction*. EMBO J, 2004. **23**(20): p. 4018-28.
98. Conley, B.A., et al., *Endoglin, a TGF-beta receptor-associated protein, is expressed by smooth muscle cells in human atherosclerotic plaques*. Atherosclerosis, 2000. **153**(2): p. 323-35.
99. Ma, X., et al., *Endoglin is overexpressed after arterial injury and is required for transforming growth factor-beta-induced inhibition of smooth muscle cell migration*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000. **20**(12): p. 2546-52.

100. Jerkic, M., et al., *Reduced angiogenic responses in adult Endoglin heterozygous mice*. Cardiovasc Res, 2006. **69**(4): p. 845-54.
101. Jerkic, M., et al., *Endoglin regulates cyclooxygenase-2 expression and activity*. Circ Res, 2006. **99**(3): p. 248-56.
102. Guerrero-Esteo, M., et al., *Endoglin overexpression modulates cellular morphology, migration, and adhesion of mouse fibroblasts*. Eur J Cell Biol, 1999. **78**(9): p. 614-23.
103. Li, C., et al., *CD105 antagonizes the inhibitory signaling of transforming growth factor beta1 on human vascular endothelial cells*. FASEB J, 2000. **14**(1): p. 55-64.
104. Li, C., et al., *CD105 prevents apoptosis in hypoxic endothelial cells*. J Cell Sci, 2003. **116**(Pt 13): p. 2677-85.
105. Warrington, K., et al., *Functional role of CD105 in TGF-beta1 signalling in murine and human endothelial cells*. Anticancer Res, 2005. **25**(3B): p. 1851-64.
106. Miltenyi, S., et al., *High gradient magnetic cell separation with MACS*. Cytometry, 1990. **11**(2): p. 231-8.
107. Kerr, J.F., A.H. Wyllie, and A.R. Currie, *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics*. Br J Cancer, 1972. **26**(4): p. 239-57.
108. Bortner, C.D., N.B. Oldenburg, and J.A. Cidlowski, *The role of DNA fragmentation in apoptosis*. Trends Cell Biol, 1995. **5**(1): p. 21-6.
109. Gavrieli, Y., Y. Sherman, and S.A. Ben-Sasson, *Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation*. J Cell Biol, 1992. **119**(3): p. 493-501.
110. Kleinman, H.K., et al., *Isolation and characterization of type IV procollagen, laminin, and heparan sulfate proteoglycan from the EHS sarcoma*. Biochemistry, 1982. **21**(24): p. 6188-93.
111. Vukicevic, S., et al., *Identification of multiple active growth factors in basement membrane Matrigel suggests caution in interpretation of cellular activity related to extracellular matrix components*. Exp Cell Res, 1992. **202**(1): p. 1-8.
112. Thedinga, E., et al., *Online monitoring of cell metabolism for studying pharmacodynamic effects*. Toxicol Appl Pharmacol, 2007. **220**(1): p. 33-44.
113. Ma, N., et al., *Human cord blood cells induce angiogenesis following myocardial infarction in NOD/scid-mice*. Cardiovasc Res, 2005. **66**(1): p. 45-54.
114. Zhou, B., et al., *Adult mouse epicardium modulates myocardial injury by secreting paracrine factors*. J Clin Invest, 2011. **121**(5): p. 1894-904.
115. Henning, R.J., et al., *Human cord blood cells and myocardial infarction: effect of dose and route of administration on infarct size*. Cell Transplant, 2007. **16**(9): p. 907-17.

116. Tian, F., et al., *Endothelial cells are activated during hypoxia via endoglin/ALK-1/SMAD1/5 signaling in vivo and in vitro*. Biochem Biophys Res Commun, 2010. **392**(3): p. 283-8.
117. Jenhani, F., et al., *Human cytokine expression profile in various conditioned media for in vitro expansion bone marrow and umbilical cord blood immunophenotyped mesenchymal stem cells*. Transplant Proc, 2011. **43**(2): p. 639-43.
118. Kadam, S.S., S. Tiwari, and R.R. Bhonde, *Simultaneous isolation of vascular endothelial cells and mesenchymal stem cells from the human umbilical cord*. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 2009. **45**(1-2): p. 23-7.
119. Chen, M.Y., et al., *Endothelial differentiation of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells in comparison with bone marrow-derived mesenchymal stem cells*. Exp Hematol, 2009. **37**(5): p. 629-40.
120. Rebelatto, C.K., et al., *Dissimilar differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, and adipose tissue*. Exp Biol Med (Maywood), 2008. **233**(7): p. 901-13.
121. Hao, J., et al., *Elevation of expression of Smads 2, 3, and 4, decorin and TGF-beta in the chronic phase of myocardial infarct scar healing*. J Mol Cell Cardiol, 1999. **31**(3): p. 667-78.
122. Scherner, O., et al., *Endoglin differentially modulates antagonistic transforming growth factor-beta1 and BMP-7 signaling*. J Biol Chem, 2007. **282**(19): p. 13934-43.
123. Ghosh, A.K. and D.E. Vaughan, *PAI-1 in tissue fibrosis*. J Cell Physiol, 2011. **227**(2): p. 493-507.
124. Finnson, K.W., et al., *Endoglin differentially regulates TGF-beta-induced Smad2/3 and Smad1/5 signalling and its expression correlates with extracellular matrix production and cellular differentiation state in human chondrocytes*. Osteoarthritis Cartilage, 2010. **18**(11): p. 1518-27.
125. Garcia-Pozo, L., et al., *[Endoglin: structure, biological functions, and role in fibrogenesis]*. Rev Esp Enferm Dig, 2008. **100**(6): p. 355-60.
126. Chen, K., et al., *Transforming growth factor beta receptor endoglin is expressed in cardiac fibroblasts and modulates profibrogenic actions of angiotensin II*. Circ Res, 2004. **95**(12): p. 1167-73.
127. Morris, E., et al., *Endoglin promotes TGF-beta/Smad1 signaling in scleroderma fibroblasts*. J Cell Physiol, 2011. **226**(12): p. 3340-8.
128. Leask, A., et al., *Dysregulation of transforming growth factor beta signaling in scleroderma: overexpression of endoglin in cutaneous scleroderma fibroblasts*. Arthritis Rheum, 2002. **46**(7): p. 1857-65.
129. Bertolino, P., et al., *Transforming growth factor-beta signal transduction in angiogenesis and vascular disorders*. Chest, 2005. **128**(6 Suppl): p. 585S-590S.

130. Pece-Barbara, N., et al., *Endoglin null endothelial cells proliferate faster and are more responsive to transforming growth factor beta1 with higher affinity receptors and an activated Alk1 pathway*. J Biol Chem, 2005. **280** 6(30): p. 27800-27808 .
131. Lee, N.Y., et al., *Endoglin promotes transforming growth factor beta-mediated Smad 1/5/8 signaling and inhibits endothelial cell migration through its association with GIPC*. J Biol Chem, 2008. **283**(47): p. 32527-33.
132. Drechsler, S. and J. Andrae, *Online monitoring of metabolism and morphology of peptide-treated neuroblastoma cancer cells and keratinocytes*. Journal of Bioenergetics and Biomembranes, 2011(43): p. 275-285.
133. Mylotte, L.A., et al., *Metabolic flexibility permits mesenchymal stem cell survival in an ischemic environment*. Stem Cells, 2008. **26**(5): p. 1325-36.
134. Garland, J.M. and A. Halestrap, *Energy metabolism during apoptosis. Bcl-2 promotes survival in hematopoietic cells induced to apoptose by growth factor withdrawal by stabilizing a form of metabolic arrest*. J Biol Chem, 1997. **272**(8): p. 4680-8.
135. Imahashi, K., et al., *Transgenic expression of Bcl-2 modulates energy metabolism, prevents cytosolic acidification during ischemia, and reduces ischemia/reperfusion injury*. Circ Res, 2004. **95**(7): p. 734-41.
136. Madeira, C., et al., *Nonviral gene delivery to mesenchymal stem cells using cationic liposomes for gene and cell therapy*. J Biomed Biotechnol. **2010**: p. 735349.
137. Kim, S.H., et al., *Comparative evaluation of target-specific GFP gene silencing efficiencies for antisense ODN, synthetic siRNA, and siRNA plasmid complexed with PEI-PEG-FOL conjugate*. Bioconjug Chem, 2006. **17**(1): p. 241-4.
138. Baksh, D., R. Yao, and R.S. Tuan, *Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow*. Stem Cells, 2007. **25**(6): p. 1384-92.
139. Helledie, T., V. Nurcombe, and S.M. Cool, *A simple and reliable electroporation method for human bone marrow mesenchymal stem cells*. Stem Cells Dev, 2008. **17**(4): p. 837-48.
140. Yang, F., et al., *Gene delivery to human adult and embryonic cell-derived stem cells using biodegradable nanoparticulate polymeric vectors*. Gene Ther, 2009. **16**(4): p. 533-46.
141. Potier, E., et al., *Prolonged hypoxia concomitant with serum deprivation induces massive human mesenchymal stem cell death*. Tissue Eng, 2007. **13**(6): p. 1325-31.
142. Rosova, I., et al., *Hypoxic preconditioning results in increased motility and improved therapeutic potential of human mesenchymal stem cells*. Stem Cells, 2008. **26**(8): p. 2173-82.

143. Nguyen, L.T., et al., *Complex formation with plasmid DNA increases the cytotoxicity of cationic liposomes*. Biol Pharm Bull, 2007. **30**(4): p. 751-7.
144. Stamm, C., et al., *Intramyocardial delivery of CD133+ bone marrow cells and coronary artery bypass grafting for chronic ischemic heart disease: safety and efficacy studies*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2007. **133**(3): p. 717-25.
145. Liu, J.W., et al., *Characterization of endothelial-like cells derived from human mesenchymal stem cells*. J Thromb Haemost, 2007. **5**(4): p. 826-34.

Anhang

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Remodelingprozesse des Herzens im Tiermodell nach experimentell induzierten Infarkt. (Bearbeitet nach Opie 2006).....	10
Abb. 2: Mikroskopische Vorgänge beim <i>Remodeling</i> : Hypertrophie und Längenzunahme der Kardiomyozyten, interstitielle Kollageneinlagerung, Abnahme der kapillären Dichte; CM Kardiomyozyten, D <i>Discus intercalaris</i> , I Interstitium, K Kapillare, N <i>Nucleus</i>	11
Abb. 3: Differenzierungswege von MSC (entnommen aus: Mesenchymal stem cells of human adult bone marrow. Pittenger, Mark und Marshak, Daniel in: Stem cell biology. Marshak, Daniel; Gardner, Richard und Gottlieb, Daniel; New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001).....	15
Abb. 4: Übersicht der parakrinen Effekte von MSC und der entsprechenden Faktoren. (bearbeitet nach da Silva Meirelles [52]).....	18
Abb 5: Signalweg von CD105/Endoglin in Endothelzellen.	21
Abb 6: A: Aufsicht auf das Mäuseherz nach Ligatur (dünner Pfeil) mit sichtbar abgeblassten Infarktgebiet (dicker Pfeil), B: Injektion (dünner Pfeil) der MSC in die Grenzzone des Infarktes (dicker Pfeil).	26
Abb. 7: Darstellung (links) der vier Schnittebenen am kryokonservierten Herz. Grafische Auswertung (rechts) der mit Sirius Red und Fast Green gefärbten Schnitte. Infarktgewebe (rot; blau umrandet), vitales Myokard (grünblau; rot umrandet)	28
Abb. 8: Prinzip der Magnetseparation (A) Eine Zellsuspension passiert die MACS®-Säule in einem starken Magnetfeld. Mit <i>MicroBeads</i> markierte Zellen werden zurückgehalten. Rote Zellen = mit <i>MicroBeads</i> markiert, weiße Zellen = ohne <i>MicroBeads</i> . (B) Die zuvor zurückgehaltenen Zellen werden aus der Säule ausgewaschen.	33
Abb. 9: Antisense-ODN: Die Antisense-Oligodesoxynukleotide binden im Zytoplasma an das Startcodon der mRNA und verhindern somit die Translation.	35
Abb. 10: Prinzip der Durchflusszytometrie: Die Zellen einer Einzelzellsuspension werden durch eine Messküvette geleitet. Durch hydrodynamische Fokussierung werden diese wie an einer Perlenschnur aufgereiht und passieren mehrere Laserstrahlen. (bearbeitet nach Betriebsanleitung FACSScan®).....	39
Abb. 11: Korrespondierende Schnitte der Herzen 6 Wochen nach Myokardinfarkt ohne (MI-C) oder mit Injektion von hMSC (MI-CB und MI-CB105). Rot gefärbt sind Gebiete mit Kollagenablagerung respektive Infarkt. Grün-türkis entspricht gesundem Herzmuskel....	44
Abb. 12: Die Infarktgröße ist als prozentualer Anteil an der Herzmuskelschnittfläche	

dargestellt. Mit CD105-angereicherten hMSC aus Nabelschnurblut (MI-CB105⁺) zeigen eine signifikante Reduktion des Infarktareals gegenüber der Kontrollgruppe (MI-C). Nicht angereicherte Nabelschnurblut-hMSC bewirken keinen signifikanten Effekt. Mittelwert \pm Standardfehler, * $p < 0,05$ vs. MI-C, $n=7$ 45

Abb. 13: Kapilläre Dichte in Kapillaren/HPF. MI-CB105⁺ zeigt in der Grenz- und Vergleichszone eine signifikant höhere kapilläre Dichte als MI-C und MI-CB. * $p < 0,05$ vs MI-C, # $p < 0,05$ vs MI-CB, $n=5$ 46

Abb. 14: Repräsentative Bilder der CD31-Färbung aus der Grenzzone in Höhe der Ebene C. Links: Kontrollgruppe, Mitte: MI-CB, Rechts: MI-CBCD105⁺, Vergrößerung 400 \times 46

Abb. 15: Azidifikationsrate von CB-hMSC und CD105-angereicherten CB-hMSC (CBCD105) unter 24 h Hypoxie. CB-hMSC zeigen eine signifikant höhere Azidifikationsrate zwischen 2 h und 24 h gegenüber CD105 angereicherten CB-hMSC (* $p < 0,05$). 47

Abb. 16: Impedanz von CB-hMSC und CD105-angereicherten CB-hMSC (CBCD 105) unter 24 h Hypoxie. CB-hMSC zeigen eine signifikant höhere Impedanz/Zelladäsion zwischen 2 h und 24 h gegenüber CD105 angereicherten CB-hMSC (* $p < 0,05$). 48

Abb 17: Apoptotische Zellen in Prozent nach 36 h Hypoxie. CB: hMSC aus Nabelschnurblut, CB105: CD105 angereicherte hMSC aus Nabelschnurblut, * $p < 0,05$. 49

Abb 18: Apoptotische Zellen in Prozent nach 36 h Hypoxie und Serumentzug. Partiiell CD105-geblockte hMSC (*Antisense*) weisen eine signifikant höhere Apoptoserate auf als hMSC, die mit Scrambled-DNA behandelt wurden, * $p < 0,05$ 50

Abb. 19: Repräsentative Bilder der TUNEL-Färbung (grün) an hMSC nach 36 h Hypoxie in der oberen Reihe; untere Reihe: gleicher Bereich mit Darstellung aller Zellen mittels Propidiumjodid (rot) 50

Abb. 20: hMSC 24 h nach Transfektion mit einem GFP-Plasmid. (A) Lichtmikroskopische Aufnahme, (B) Fluoreszenzmikroskop im 520 nm-Emissionsfilter... 51

Abb. 21: FACS-Analyse: CD105-positve Zellen nach 24 h Transfektion 51

Abb. 22: Netzwerkformation unter dem Lichtmikroskop (400x) 52

Abb. 23: Netzwerklänge pro Gesichtsfeld in μm ($n = 3$). 53

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Funktion, Eigenschaften und Vorkommen von CD105/Endoglin 23

Tabelle 2: Für die operative Versuchsdurchführung benötigte Materialien 27

Tabelle 3: Medikamente 28

Tabelle 4: Färbung mit Siriusred und Fastgreen	29
Tabelle 5: CD31 und DAPI	30
Tabelle 6: Materialien für die Kultivierung	34
Tabelle 7: Materialien für die Magnetseparation	34
Tabelle 8: Materialien für Lipofektion mit ODN.....	36
Tabelle 9: Materialien für Apoptosebestimmung	38
Tabelle 10: Allgemeine Materialien	42

Danksagung

Ich möchte mich sehr bei Herrn Prof. Steinhoff für die zur Verfügungstellung des Themas, die vielen hilfreichen Ratschläge und motivierenden Begleitung bedanken.

Für die Supervision und Anleitung möchte ich der Laborleiterin PD Dr. phil. Nan Ma herzlich danken.

Dr. rer. nat. Dario Furlani möchte ich danken für die Courage einem gestrandeten Doktoranden eine zweite Chance gegeben, immer an das Gelingen geglaubt und in schwierigen Situationen mit Rat und Tat zur Seite gestanden zu haben.

Dr. rer. nat. Ralf Gäbel, obwohl zu mir gekommen wie die Jungfrau zum Kinde, war immer da, immer ansprechbar, immer guter Laune und korrigierte die Arbeit auch noch aus seinem Krankenbett. Mehr Beistand kann man sich nicht wünschen.

Ich danke allen Mitarbeitern der FKGO allen voran Whengzou, Margit, Evgenya, Peter und Bianca für die freundschaftliche und anregende Atmosphäre.

Meiner Verlobten Eliska danke ich für die beständigen Motivationsreden, Ihre Liebe, ihr Verständnis und ihre Geduld, wenn der Abend oder ein Teil des Urlaubes doch wieder der Dissertation gewidmet war. Meinen Eltern und Großeltern danke ich, dass sie es mir überhaupt erst ermöglicht haben, dieses Studium zu absolvieren. Ohne Euch wäre ich nie so weit gekommen. Meinen Freunden danke ich für die Ablenkungen, welche von Zeit zu Zeit auch nötig waren, um mit frischem Elan an den nächsten Abschnitt zu gehen: Torsten, Martin, Anna, Behnaz, Carsten, Ramona, Dane, Barbara und Axel.

Thesen

Ziel dieser Arbeit war es die Wirkung von CD105 auf humanen MSC zu untersuchen sowie den Einfluss auf das Regenerationspotential der hMSC in der Behandlung des AMI. Besonders sollten dabei die Effekte auf Fibrose, Angiogenese und Zellüberleben beleuchtet werden.

1. Der akute Myokardinfarkt ist eine der häufigsten Todesursachen in Deutschland.
2. Hauptursache des akuten Myokardinfarkts ist die Arteriosklerose, welche über Plaqueruptur und Thrombusbildung zu einem Verschluss einer Koronararterie führt.
3. Die derzeitige Standardtherapie ist eine frühzeitige Intervention durch perkutane Koronarintervention zur Rekanalisation der betroffenen Koronararterie um das noch rettbar Myokard zu reperfundieren. Regenerative Therapien haben noch keinen Eingang in die Behandlung gefunden.
4. Im Rahmen des kardialen *Remodelings* nach Herzinfarkt, welches durch konzentrisch-exzentrische Hypertrophie und Fibrose gekennzeichnet ist, kann es zu einem fortschreitenden Funktionsverlust des Herzens kommen.
5. Multipotente mesenchymale Stromazellen werden nicht mehr als mesenchymale Stammzellen bezeichnet, da sie pro forma nicht die Eigenschaft zur langdauernden Selbsterneuerung besitzen.
6. MSC werden anhand der drei Kriterien Adhäsion auf Kunststoffoberflächen, ein bestimmtes Spektrum an Oberflächenmolekülen und dem Differenzierungspotential zu Knochen, Knorpel und Fettgewebe identifiziert.
7. MSC können auch andere Gewebe mesenchymalen Ursprungs, wie Skelettmuskel, Sehne oder Kardiomyozyten bilden.
8. MSC wurden bereits erfolgreich in der Therapie des Herzinfarkts sowohl im Tierexperiment als auch am Menschen getestet, wobei verschiedene Mechanismen wie direkte Transdifferenzierung zu Kardiomyozyten und Endothelzellen als auch parakrine Mechanismen für diese Wirkung verantwortlich gemacht werden.
9. Das Oberflächenmolekül CD105, das in hohem Maße auf MSC exprimiert wird hat antiapoptotische und proangiogenetische Eigenschaften und wird unter Hypoxie hochreguliert.
10. Das Myokardinfarktmodell der Maus ist eine Methode anhand derer sich sowohl Folgen als auch potentielle Therapieansätze des Myokardinfarkts studieren lassen.

11. Teilaspekte des kardialen *Remodelings* nach Myokardinfarkt lassen sich durch immunhistochemische Methoden zur Infarktgrößenbestimmung und Kapillardichte untersuchen.
12. Humane MSC lassen sich auf verhältnismässig einfache Weise gewinnen und kultivieren sowie mit Hilfe eines Magnetzellseparationsverfahrens CD105-positive MSC anreichern.
13. Neben der Anreicherung bildet der Ansatz über die selektive Blockade von CD105 auf mRNA-Niveau durch *Antisense*-ODN die Möglichkeit, MSC *in vitro* auf apoptisches, angiogenetisches und metabolisches Verhalten hin zu untersuchen.
14. Die Lipofektion ist ein geeignetes Verfahren, mit dem sich hMSC transfizieren lassen.
15. Die Applikation nach Herzinfarkt von einer mit CD105-positiven hMSC angereicherten Population aus Nabelschnurblut führt zu einer Infarktgrößenreduktion und Erhöhung der kapillären Dichte im Myokard und somit zur verbesserten kontraktilen Funktionalität.
16. CD105 bewirkt in humanen MSC eine erhöhtes Überleben und geringere metabolische Aktivität unter hypoxischen Bedingungen.
17. Humane MSC sind in der Lage kapillarähnliche Netzwerke zu bilden.
18. Die antifibrotischen Eigenschaften von CD105 auf das Myokard werden wahrscheinlich über eine Modulation des TGF-beta-Signalweges vermittelt.
19. Der positive Effekt auf die Angiogenese im Myokard wird wahrscheinlich durch parakrine Effekte und weniger durch Transdifferenzierung der hMSC zu Endothelzellen bewirkt.
20. Ob eine Präselektionierung von CB-MSC bezüglich CD105 sich auch positiv auf die Morbidität und das Gesamtüberleben nach Myokardinfarkt auswirkt, müssen sowohl tierexperimentelle als auch klinische Studien zeigen, welche diese Endpunkte untersuchen.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

„Der Einfluss von CD105 auf das Regenerationspotential humaner multipotenter mesenchymaler Stromazellen in einem Myokardinfarktmodell der Maus“

selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe angefertigt habe. Es wurden von mir ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen. Eine Promotionsarbeit über dieses Thema liegt noch nicht vor.

Rostock, den 30.4.2013

Johannes Frank